

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
27. November 2003 (27.11.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/097089 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 39/155**, C12N 15/45, 15/85, 7/04, 7/07, C07K 14/115, 14/11

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/05187

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
16. Mai 2003 (16.05.2003)

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 21 836.6 16. Mai 2002 (16.05.2002) DE

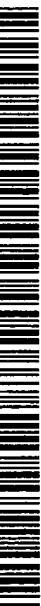
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG [DE/DE]; Heinz-Lohmann-Strasse 4, 27472 Cuxhaven (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NAYLOR, Clive, J. [GB/GB]; Treetops 5, Neston, Cheshire CH 64 OXD (GB).

(74) Anwälte: HOFFMANN EITLE usw.; Arabellastrasse 4, 81925 München (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



A2

(54) Title: ATTENUATION OF METAPNEUMOVIRUS

(54) Bezeichnung: ATTENUIERUNG VON METAPNEUMOVIRUS

(57) Abstract: The invention relates to a vaccine against members of the genus metapneumovirus or RSV or a virus that comprises a significant genetic homology in the F protein to members of the genus metapneumovirus, whereby the vaccine is an attenuated live vaccine. In particular, the vaccine is directed against metapneumovirus of avian or human origin.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft einen Impfstoff gegen Mitglieder der Gattung Metapneumovirus oder RSV oder ein Virus, das eine bedeutende genetische Homologie im F-Protein zu Mitgliedern der Gattung Metapneumovirus aufweist, wobei der Impfstoff ein attenuierter Lebendimpfstoff ist. Insbesondere ist der Impfstoff gegen Metapneumovirus von aviärem oder menschlichem Ursprung gerichtet.

**WO 03/097089**

### Attenuierung von Metapneumovirus

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Impfstoff gegen Mitglieder der Gattung Metapneumovirus oder RSV, wobei der Impfstoff ein attenuierter Lebendimpfstoff ist. Insbesondere ist der Impfstoff gegen Metapneumovirus von aviärem oder menschlichem Ursprung gerichtet.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren für die Herstellung eines Impfstoffs, der gegen Mitglieder der Gattung Metapneumovirus oder RSV gerichtet ist. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein attenuiertes lebendes Virus, das der Gattung Metapneumovirus angehört. Sie betrifft auch eine Wirtszelle, umfassend ein solches Virus. Die vorliegende Erfindung ist auch auf eine spezifische DNA- oder cDNA- oder RNA-Sequenz wie auch einen Vektor oder ein Plasmid gerichtet, umfassend die DNA-, cDNA- oder RNA-Sequenz.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein F-Protein, das modifiziert ist und die Verwendung des F-Proteins für die Herstellung eines Impfstoffs zur Verhinderung einer Störung oder Krankheit, ausgelöst durch Viren, die der Gattung Metapneumovirus angehören oder RSV.

Die Paramyxovirinae- und Pneumovirinae-Subfamilien der Paramyxoviridae-Familie beinhalten mehrere wichtige Pathogene für Menschen und Tiere. Die Pneumovirinae sind taxonomisch in die Pneumovirus- und die Metapneumovirus-Gattung unterteilt. Das menschliche respiratorische syncytische Virus, die Typart der Pneumovirus-Gattung, die auch unten weiter beschrieben wird, gilt als einziger und wichtigster Auslöser von Erkrankungen des unteren Respirationstrakts im Babyalter und während der frühen Kindheit weltweit. Andere Mitglieder der Gattung Pneumovirus beinhalten das bovine respiratorische syncytische Virus, das ovine respiratorische syncytische Virus und das Pneumonievirus bei Mäusen. Das aviäre Pneumovirus APV wird ebenfalls unten weiter beschrieben, und

war früher als Truthahn-Rhinotracheitis-Virus (TRTV) bekannt. Es gilt als etiologisches Agens von oberer RTI und wurde früher als einziges Mitglied der vor kurzem geschaffenen Gattung Metapneumovirus betrachtet.

Die Familie der Paramyxoviridae umfaßt eine Vielzahl von unterschiedlichen Viren, die an unterschiedlichen mehr oder weniger schweren Störungen oder Erkrankungen sowohl bei Menschen als auch bei Tieren beteiligt sind. Die Paramyxoviridae enthalten ein einzelnes Molekül einer einzelsträngigen negativen RNA als Genom und sind alle mit akuter respiratorischer Erkrankung des Wirts assoziiert (Pringe, C.R. (1987) in Molecular Basis of Virus Disease, Hrsg. W.C. Russell und J.W. Almond, Society for General Microbiology, Bd. 40, Seiten 91-138, Cambridge University Press). Von den vielen Viren dieser Familie hat das respiratorische syncytische Virus (RS-Virus) nach dem Masernvirus die signifikanteste klinische Wirkung beim Menschen. Das menschliche RS-Virus ist der Hauptgrund für schwere Erkrankungen des unteren Respirationstrakts bei Kindern, was weltweit zu jährlichen Epidemien führt (Chanock et al., 1991, in "Viral Infections of Humans", Seiten 525-544, Hrsg. A.S. Evans, Plenum Press). Obwohl es zwischen den Pneumoviren, zu denen das RS-Virus gehört, und anderen Paramyxoviridae nur eine beschränkte Nucleotid- oder Aminosäuresequenz-Homologie gibt, gibt es gewisse wichtige Strukturmerkmale, wie das Hauptnucleoprotein (N) und das F-Protein (F), die in Proteinen mit ähnlichen Funktionen in einem breiten Bereich von Viren konserviert sind (Barr et al., 1991, J. of Gen. Virol. 72, 677-685; Chambers et al., 1990, J. of Gen. Virol. 71, 3075-3080). Bei den Paramyxoviridae werden verschiedene RNA-Syntheseverfahren durch den Helionucleocapsidkomplex durchgeführt, der durch eine Assoziation der genomischen RNA, das Nucleoprotein, ein Phosphoprotein (P) und das Polymerase-(L)-Protein gebildet wird. Die Funktion des Nucleoproteinkomplexes hängt von der Gegenwart aller drei Proteine, die in Wechselwirkung

miteinander sowie der genomischen RNA und möglicherweise mit anderen Virus- und/oder Zellbestandteilen treten, ab (Barik, 1992, J. of Virol. 66, 6813-6818). Die Reifung des Virions hängt von einer Reihe von Wechselwirkungen zwischen dem Ribonucleoproteinkomplex, dem Matrix-(M)-Protein und den Virusglycoproteinen ab, die in die modifizierte Zellmembran eingebettet sind. Bei Pneumoviren, wie RS, sind zwei weitere Proteine, nämlich ein membranassoziiertes kleines hydrophobes (SH)-Protein und ein zweites Matrixprotein (M2) ebenfalls an der Virionstruktur und vermutlich dem Zusammenbau beteiligt, jedoch in noch kaum verstandener Weise. Die Funktion der Pneumovirusproteine, die als NS1 und NS2 bezeichnet werden, ist nicht bekannt und sie scheinen nicht einen Teil des Viruspartikels zu bilden (Collins, 1991, in The Paramyxoviruses, Seiten 103-162, Hrsg. D.W. Kingsbury, Plenum Press).

Ein weiteres ökonomisch wichtiges Virus, das zur Familie der Paramyxoviridae gehört, ist das APV-Virus, das früher als TRT-Virus bezeichnet wurde. Das APV-Virus ist ein Mitglied der Gattung Metapneumovirus. Es löst die Truthahn-Rhinotracheitis aus, wobei es sich um eine akute respiratorische Erkrankung bei Truthähnen handelt. Es wurde erstmalig Ende der siebziger Jahre in Südafrika und später in Europa und anderen Teilen der Welt beschrieben. Die Krankheit ist eine der Hauptgründe für ökonomische Verluste in der Truthahnindustrie in den letzten Jahren. In Europa werden im allgemeinen die Serotypen A und B von APV gefunden, während in den USA ähnliche Infektionen in Colorado nachgewiesen wurden. Der daraus isolierte APV-Stamm ist der sogenannte Colorado- oder C-Stamm. Ein anderer APV-Stamm wurde aus Enten in Frankreich isoliert. Abgesehen von den Typen A, B und C gibt es vermutlich weitere non-A,non-B-Arten von APV. Dadurch ist APV ein aviäres Mitglied der Gattung Metapneumovirus, das erstmalig aus Vögeln isoliert wurde. Die aviären Metapneumoviren sind vermutlich auch an dem "swollen head syndrome" beteiligt, das zu massiven Produktionsverlusten bei

Hennen führen kann. Das aviäre Metapneumovirus (APV) ist ein pleiomorphes RNA-Virus mit einem in der Hülle lokalisierten Fusionsprotein (F) und Spikes, bestehend aus Glycoproteinen (G). Es wird als "Metapneumovirus" bezeichnet. Das Virus hat keine hämagglutinierenden Eigenschaften. Basierend auf den Nucleotiden und der geschätzten Aminosäuresequenz des Glycoproteins (G) wurde das ursprüngliche APV in zwei Unterarten klassifiziert. Ursprünglich war APV aus Südafrika und Großbritannien von der Unterart A und die weiteren europäischen APV-Stämme gehörten zum Subtyp B. Wie oben angegeben, ist jetzt auch der Subtyp C bekannt, zusätzlich zu vermutlich weiteren Subtypen, die non-A non-B sind.

Das aviäre Metapneumovirus kann in Trachealringkulturen kultiviert werden, wo es eine ciliostatische Wirkung ausübt. Weiterhin kann es in embryonisierten Eiern und anderen Zellkulturen kultiviert werden. Die amerikanischen Stämme wurden auch in HEF (Embryofibroblasten von Hennen), Verozellen und embryonisierten Eiern kultiviert.

Die klinischen Symptome der Truthahn-Rhinotracheitis korrespondieren zu denjenigen einer akuten rhinotracheitischen Infektion. Zwei bis drei Tage nach der Infektion sind die Tiere apathisch und zeigten Husten, Niesen und Kopfschütteln. Wenn sich die Infektion nicht kompliziert, sind die Tiere sieben bis acht Tage nach der Infektion wieder normal. Die klinischen Symptome bei Hennen korrespondieren zu denjenigen bei Truthähnen, sind in der Regel jedoch weniger schwer. Wenn zusätzlich *E. coli* oder andere Bakterien beteiligt sind, können hohe Verluste auftreten und die tatsächliche Zeitspanne der Krankheit kann in unangenehmer Weise verlängert werden. Jedoch führt APV bei Hühnern nur selten zu dem "swollen head syndrome" mit massiven Verlusten. Es ist wahrscheinlich wichtiger für die kontinuierlichen Verluste aufgrund geringerer klinischer Erkrankungen. Nach der Infektion mit konventionellem APV erzeugen Hennen und Truthähne neutralisierende Antikörper im Serum, die durch

ELISA nachweisbar sind. Diese Antikörper scheinen keine wirkliche Bedeutung für die Kontrolle der Rhinotracheitis zu haben.

Mütterliche Antikörper sind für Küken gegen eine Frühinfektion mit viralem APV nicht wirksam. Zirkulierende Antikörper scheinen jedoch für den Schutz der Gonaden im Falle einer Infektion von älteren Tieren wichtig zu sein.

Lokale Antikörper scheinen eine wichtige protektive Wirkung aufzuweisen. Virusspezifische IgA- und IgG-Antikörper mit einem virusneutralisierenden Effekt treten nach Infektionen mit virulentem APV in der Tränenflüssigkeit auf. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist für die Behandlung von APV-Infektionen keine Therapie bekannt. Mit Ausnahme der USA versucht man, APV durch Vakzinierung zu kontrollieren.

Ein anderes wichtiges Mitglied der Paramyxoviridae ist das neu entdeckte menschliche Metapneumovirus, das aus jungen Kindern mit einer Erkrankung des Respirationstrakts isoliert wurde. Dieses Virus wurde aus 28 jungen Kindern in den Niederlanden isoliert und wurde als neues Mitglied der Gattung Metapneumovirus, basierend auf virologischen Daten, Sequenzhomologie und Genkonstellation, identifiziert (Van Den Hoogen et al., Nature, Medicine, Bd. 7, Nr. 6, Juni 2001, Seiten 719-724). Bis zur Entdeckung dieses neuen Metapneumovirus wurde APV wie oben beschrieben als einziges Mitglied der kürzlich benannten Gattung Metapneumovirus angesehen (Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Hrsg. Van Regenmortel, M.H., Fauquet, C.M. und Bishop, D.H.) 551, 557, 559-560 (Academic, San Diego, 2000)). In dem obigen Artikel ziehen die Autoren jedoch den Schluß, basierend auf einer Sequenzhomologie und der Genkonstellation, daß die menschlichen Viren ein neues Mitglied der Gattung Metapneumovirus zu sein scheinen und haben diese daher vorläufig als menschliches Metapneumovirus bezeichnet. Eine

genetische Homologie zwischen dem menschlichen MPV und zum Beispiel APV in der Region des F-Proteins liegt z.B. so hoch wie 80 %. Es wird also angenommen, daß das menschliche Metapneumovirus ursprünglich aus Vögeln stammen könnte und sich vor Jahren in der menschlichen Population verteilt hat.

Wie bereits oben angegeben, gibt es bis jetzt keine Behandlung für die obigen Erkrankungen.

Daher fokussierte sich die Aufmerksamkeit auf die Vakzination. Jedoch auch bei der Vakzination gibt es bis jetzt noch keinen erhältlichen Impfstoff, der einen langzeitigen und sicheren Schutz gegen die obigen Erkrankungen, die mit Viren z.B. der Gattung Metapneumovirus assoziiert sind, gibt.

Im Hinblick auf RSV bleibt die Entwicklung eines Vakzins ein wichtiges Ziel im Hinblick auf die klinische Wichtigkeit dieses Pathogens. Die gegenwärtigen Ansätze involvieren die Verwendung von temperaturempfindlichen Mutanten. Versuche, einen geeigneten Impfstoff gegen das RS-Virus bereitzustellen, haben sich auf zwei interessante Bereiche fokussiert, die spezifische Region der Polymerase (L-Gen), einschließlich der putativen ATP-Bindungsstelle und der hoch konservierten zentralen Domäne der Polymerase und eine Mutation in der extrazellulären Domäne des Fusionsproteins (F), von dem nachgewiesen wurde, daß es auch in einem unabhängig abgeleiteten, kodierten aktiven attenuierten Mutanten vorliegt (Connors et al., 1995, Virology 208, Seiten 478-484 und Tolley et al., 1996, Vaccine 14, 1637-1646).

Es wird versucht, eine Kontrolle von APV zu erreichen, indem z.B. attenuierte Lebendimpfstoffe durch Passage eines virulenten aviären Metapneumovirus in vitro erzeugt werden. Es konnte gezeigt werden, daß ungefähr 100 Passagen in Trachealringkulturen die Virulenz nicht verminderten, jedoch limitierten 39 Passagen in Embryoblasten von Hühnern die

Immunogenität wie auch die Virulenz. Die Passage in Vero-Zellen reduzierte die Virulenz auf Null, erhielt jedoch die Immunogenität im wesentlichen; dadurch konnten akzeptable Vakzine erzeugt werden.

Lebendvakzine werden in der Regel für Küken um Tag 1 als Spray oder Augentropfen verwendet. Einige Hersteller empfehlen, die Immunisierung mit Lebendvakzinen einmal oder mehrmals zu wiederholen. Die Lebendvakzine, die zur Zeit auf dem Markt sind, werden aus unterschiedlichen Stämmen von unterschiedlichen Arten erzeugt und sind mehr oder weniger attenuiert. Manchmal werden auch inaktivierte Vakzine für ältere Tiere verwendet, obwohl diese selbst in diesem Fall in der Regel zunächst mit einem Lebendvakzin vakziniert werden.

Bis jetzt sind die Lebendvakzine vom Subtyp A oder B. Ergebnisse unterschiedlicher experimenteller Studien zeigen, daß es eine gute Kreuzreakтивität zwischen den unterschiedlichen Stämmen gibt, jedoch scheint eine homologe Protektion kompletter zu sein. Im Hinblick auf das menschliche Metapneumovirus gibt es noch gar keinen Impfstoff, da dieses auch erst kürzlich entdeckt wurde. Jedoch insbesondere im Hinblick auf das menschliche Metapneumovirus würde es besonders wünschenswert sein, einen Impfstoff zu erhalten, der einen guten und wirksamen Schutz gegen das Virus bereitstellt, das zu schweren Erkrankungen bei Kindern führt.

Es ist jedoch für alle so weit bekannten Impfstoffe nachweisbar, daß sie instabil sind und daß sie unter geeigneten Bedingungen zu einer Virulenz zurückkehren können.

Solche Eigenschaften sind natürlich bei einem Impfstoff sehr unerwünscht.

Es ist daher eine Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung, einen Impfstoff bereitzustellen, der ein attenuierter

Lebendimpfstoff sein kann, der gegen Mitglieder der Virusgattung Metapneumovirus und RSV gerichtet ist.

Insbesondere ist es eine Aufgabe, ein attenuiertes Lebendvirus bereitzustellen, das gegen Pathogene der Mitglieder der Gattung Metapneumovirus, insbesondere menschliches Metapneumovirus und APV sowie gegen RSV wirksam ist.

Weiterhin ist es eine Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Bereitstellung geeigneter Impfstoffe gegen die obigen Viren bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird durch den Gegenstand der unabhängigen Ansprüche gelöst; bevorzugte Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

Gemäß Anspruch 1 wird ein Impfstoff gegen Mitglieder der Gattung Metapneumovirus und RSV sowie gegen Viren bereitgestellt, die eine bedeutende genetische Homologie im Bereich des F-Proteins zu Mitgliedern der Gattung Metapneumovirus aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Virus oder ein Teil eines Virus umfaßt, wobei das Virus in der Region aa 293-296 der Aminosäuresequenz des F-Proteins (Fusionsprotein) modifiziert ist, im Vergleich mit dem Wildtypvirus, oder in einer Region, die dieselbe Funktion wie aa 293-296 zeigt.

Mit "Teil eines Virus" ist gemeint, daß der Impfstoff mindestens denjenigen Teil des Virus umfassen sollte, der die Modifikation in Region aa 293-296 des F-Proteins oder einer funktionell ähnlichen Region umfaßt und alle weiteren Bestandteile des Virus, die notwendig sind, so daß das Virus als Impfstoff wirken kann, d.h. Immunogenität erzeugt, jedoch nicht virulent ist. Die Erzeugung eines solchen Virus liegt im allgemeinen Fachwissen eines Fachmanns.

Die Erfindung wird weiterhin gemäß den hier eingeschlossenen Figuren beschrieben, wobei die Figuren das Folgende darstellen:

Fig. 1 Beispielhafte Sequenzänderungen während Attenuierung und Reversion

Fig. 2 Klonierungsstrategie

Fig. 3 ETC bis zum Gesamtgenom

Fig. 4 Veränderungen an Positionen aa 293-296 des Fusionsproteins

Die gewöhnliche Spaltungsstelle des Fusionsproteins F, die z.B. den A-Typ APVs und anderen APVs wie auch weiteren Mitgliedern der Paramyxoviridae gemein ist, weist ein Motiv mit basischen Aminosäuren auf, die ungefähr an Stelle aa 99-109 lokalisiert sind, wobei sie das F-Protein, wenn es durch Proteasen gespalten wird, in F1 und F2 trennt, wobei es die fusionsbezogene Domäne exponiert. Daher könnte die Bereitstellung einer erhöhten Anzahl basischer Aminosäuren in Region aa 293-296, bei der es sich um eine zweite Spaltungsstelle handeln könnte, oder einer funktionell entsprechenden Stelle, zu einer ähnlichen Spaltungsstelle für Proteasen führen.

In der Regel wird das gesamte Virus verwendet, umfassend die Modifikation in Region aa 293-296 oder einer funktionell entsprechenden Region der Aminosäuresequenz des F-Proteins. Um die Anordnung des F-Proteins in einem typischen Virus zu zeigen, insbesondere einem Metapneumovirus, wird auf Fig. 1 Bezug genommen. Figur 1 zeigt eine Möglichkeit von beispielhaften Sequenzveränderungen während Attenuierung und Reversion von Viren zu Virusimpfstoffen und zurück zu virulenten Viren.

In Fig. 1 bedeuten die Abkürzungen das Folgende:

N: Nucleocapsid; Gen: ungefähr 1.200 Basen  
P: Phosphoprotein; Gen: ungefähr 850 Basen  
M: Matrix; Gen: ungefähr 800 Basen  
F: Fusion; Gen: ungefähr 1.600 Basen  
M2: 2. Matrix; Gen: ungefähr 600 Basen  
SH: klein hydrophob; Gen: ungefähr 500 Basen  
G: Glycoprotein; Gen: ungefähr 1.100 Basen  
L: Polymerase; Gen: ungefähr 7.000 Basen

Es wird angenommen, daß das Fusionsprotein für die Fusion mit der Zielmembran verantwortlich ist. Von M2 nimmt man an, daß es sich um einen Transkriptions-Elongationsfaktor handelt, der vermutlich für die Virusrettung essentiell ist. Es enthält einen zweiten Leserahmen, der nicht exprimiert zu sein scheint. Das G-Protein könnte für die Anhaftung an einen Zielzellrezeptor verantwortlich sein. Es ist hoch glycosyliert und zwischen verschiedenen Stämmen hoch variabel. Die L-Polymerase betrifft die Transkription und Replikation des Genoms. N, P und L kombinieren sich, um die minimale Replikationseinheit bereitzustellen, die Nucleocapsid genannt wird.

Insbesondere ist das Fusionsprotein für die Fusion des Virus mit der Zielzelle verantwortlich. Es wird als F0 translatiert und wird durch zelluläre Proteasen an aa-Stellungen 99-102 (RRRR) gespalten, um F1 (enthaltend die fusionsbezogene Domäne, membrangebunden) und F2 (das nach Spaltung an F1 durch Disulphidbrücken zwischen Cysteinspaltresten angehaftet bleibt) zu bilden. Wie im Detail unten erklärt, wird die Hypothese aufgestellt, daß die potentielle zusätzliche Spaltungsstelle (aa 293-296 bei APV und hMPV und aa 323-328 bei RSV) in irgendeiner Weise die Fusion verändert und daß dies den Gewebstropismus beeinflußt.

Durchgezogene Pfeile in Fig. 1 zeigen an, daß auf DNA-Level während der Attenuierung eine Sequenzveränderung stattgefunden hat, während gestrichelte Pfeile anzeigen, daß Sequenzveränderungen während der Attenuierung und Reversion auf Proteinlevel stattgefunden haben. Auf der linken Seite ist die Virusanordnung die Virusanordnung des Wildtypvirus. Im Mittelteil von Fig. 1 ist die Virusanordnung, die in weiß dargestellt ist, die Virusanordnung eines attenuierten Virus, während auf der rechten Seite die Virusanordnung die zur Virulenz zurückgekehrte Anordnung eines Virus ist.

Aus Fig. 1 kann abgeleitet werden, daß es eine Vielzahl von möglichen Sequenzveränderungen gibt; die Sequenzveränderungen, die während Attenuierung und Reversion auftreten können und die in Fig. 1 dargestellt sind, sind nur beispielhaft.

Der Vergleich von Sequenzen vom Wildtyp, attenuiertem Virus und revertiertem Virus zeigt deutlich, daß es eine Vielzahl von Mutationen und eine Vielzahl von Kombinationen von Mutationen geben kann, die während Attenuierung und Reversion auftreten.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde überraschend festgestellt, daß eine Modifikation in der Region aa 293-296 oder einer Region mit derselben Funktionalität zu einer Erzeugung eines attenuierten Virus führt, das als Impfstoff gegen Mitglieder der Gattung Metapneumovirus oder RSV verwendet werden kann. Die vorliegenden Erfinder stellten fest, daß eine Modifikation in dieser Region ein attenuiertes Virus erzeugen wird, das seine Fähigkeit zur Virulenz verloren hat, während es immer noch eine vollständige Immunogenität bereitstellt. Außerdem wird die Modifikation in dieser Region das Risiko des Zurückkehrens zu einer Virulenz reduzieren.

Für ein besseres Verständnis der weiteren Diskussion wird die folgende Tabelle 1 bereitgestellt, die einen Überblick über die 20 Aminosäuren, ihren Einzelbuchstabenkode (SLC) und ihre korrespondierenden DNA-Kodons bereitstellt.

Tabelle 1

**20 Aminosäuren, ihr Einzelbuchstabenkode (SLC) und ihre korrespondierenden DNA-Kodons**

Aminosäure	SLC	Typ	DNA-Kodons
Isoleucin	I		ATT, ATC, ATA
Leucin	L		CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Valin	V		GTT, GTC, GTA, GTG
Phenylalanin	F		TTT, TTC
Methionin	M		ATG
Cystein	C	S-S	TGT, TGC
Alanin	A		GCT, GCC, GCA, GCG
Glycin	G		GGT, GGC, GGA, GGG
Prolin	P		CCT, CCC, CCA, CCG
Threonin	T	O glycos	ACT, ACC, ACA, ACG
Serin	S	O glycos	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Tyrosin	Y		TAT, TAC
Tryptophan	W		TGG
Glutamin	Q		CAA, CAG
Asparagin	N	N glycos	AAT, AAC
Histidin	H	basisch	CAT, CAC
Glutaminsäure	E	sauer	GAA, GAG
Asparaginsäure	D	sauer	GAT, GAC
Lysin	K	basisch	AAA, AAG
Arginin	R	basisch	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Stop-Kodons	Stop		TAA, TAG, TGA

Die Region aa 293-296 ist im F-Protein lokalisiert, nämlich dem Fusionsprotein, von Viren der Gattung Metapneumovirus und bei RSV. Die Lokalisierung der aa 293-296 Region ist zum Beispiel aus SEQ ID NOS 28 bis 34 ableitbar.

Die vorliegenden Erfinder konnten zeigen, daß, wenn die für die Aminosäuren in der aa 293-296 Region oder einer Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 in RSV des F-Gens kodierenden Kodons modifiziert wurden, attenuierte

Virusstämme erzeugt werden konnten, die ihre Immunogenität erhielten, jedoch ihre Virulenz verloren.

Es scheint, daß diese aa 293-296 Region in APV und hMPV oder aa 323-328 im RSV für die Virulenzveränderung verantwortlich war.

Der Mechanismus hierfür ist noch unklar. Ohne an diese Hypothese gebunden sein zu wollen, stellen die vorliegenden Erfinder die Theorie auf, daß diese Region durch Serinproteasen gespalten wird, jedoch durch S-S-Bindungen angehaftet bleibt, in ähnlicher Weise wie im Hinblick auf F-1 und F-2. Ein PAGE des Impfstoffs zeigt, daß es Mobilitätsveränderungen im Vergleich zum Feldvirus gibt, was mit einem solchen Ereignis assoziiert sein könnte.

Die aa 293-296 Region bei APV und hMPV wie auch aa 323-328 bei RSV scheint im wesentlichen hydrophil zu sein, wobei die meisten Aminosäuren geladen sind (R, K, H, E, D) oder polar (S). Nur eine Aminosäure, Glycin (G), ist schwach hydrophob.

Die folgenden Aminosäuresequenzen sind typisch für unterschiedliche Mitglieder der Gattung Metapneumovirus in der Region aa 293-296:

APV Typ A: RKEK (SEQ ID No 24), RKKE, REEK  
APV Typ B: RHER (SEQ ID No 25)  
APV Typ C: SGKD (SEQ ID No 26)  
menschlicher Metapneumovirus: SGKK (SEQ ID No 27)

Die folgenden Aminosäuresequenzen sind typisch für unterschiedliche Mitglieder von RSV in aa 323-328:

1: TTDNKE (SEQ ID No 79)  
2: TTNIKE (SEQ ID No 78)  
3: TTNTKE (SEQ ID No 77)

Im folgenden ist, wenn auf humanen Metapneumovirus Bezug genommen wird, der humane Metapneumovirus gemeint, wie definiert gemäß dem Artikel von Van den Hoogen et al., Nature, Medicine, Bd. 7, Nr. 6, Juni 2001, Seiten 719-724. Es erscheint wahrscheinlich, daß die hydrophile Region benötigt wird, um dem Fusionsprotein Funktion und Struktur zu verleihen. Daher sollte die Gegenwart von basischen Aminosäuren die Spaltung durch Serinproteasen begünstigen; dementsprechend sollte eine geeignete Modifikation der vier Aminosäuren in der Region aa 293-296 in APV oder hMPV wie auch eine geeignete Modifikation von aa 323-328 in RSV universell attenuierend wirken.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das oben beschriebene Virus ein attenuiertes Lebendvirus. Attenuierte Lebendviren sind auf dem Gebiet bekannt, und ihre Herstellung kann durch einen Fachmann einfach durchgeführt werden. Gemäß der vorliegenden Erfindung muß das attenuierte Lebendvirus eine Modifikation in Region aa 293-296 der Aminosäuresequenz des Fusionsproteins im Vergleich mit dem Wildtyp oder in einer Region mit derselben Funktionalität, wie z.B. aa 323-328 in RSV, beinhalten. Die Attenuation des Virus geschieht durch die Modifikation in der (den) obigen Region(en). Zusätzlich können bekannte Attenuierungsverfahren verwendet werden, die für diese Viren bereits bekannt sind.

Vorzugsweise umfaßt die Modifikation eine Stabilisierung der Region aa 293-296 oder einer Region mit derselben Funktionalität wie aa 323-328 bei RSV in dem Virus.

Die Bezeichnung "Stabilisierung" soll hier eine Situation beschreiben, in der die Aminosäuren an Position aa 293-296 oder einer Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, durch Kodons kodiert werden, die nicht leicht zum Wildtyp zurückkehren können. Vorzugsweise wird eine solche Stabilisierung durch eine Substitution von Kodons erreicht, die für Aminosäuren in der Region kodieren, durch

Kodons, die mehr Mutationen benötigen, um zum Wildtyp zurückzukehren. Eine solche Stabilisierung wird beispielhaft wie folgt dargestellt:

In diesem Beispiel ist es das Ziel, die Aminosäure Glutaminsäure (E) durch eine basische Aminosäure zu ersetzen. Glutaminsäure wird durch das DNA-Kodon GAA oder GAG kodiert. Wenn die Aminosäure Lysin (K) gewählt wird, um Glutaminsäure zu ersetzen, ergibt sich die folgende Situation: Lysin wird durch das DNA-Kodon AAA oder AAG kodiert. Wenn das DNA-Kodon AAA für Lysin gewählt wird, wird eine Mutation benötigt, um zum DNA-Kodon GAA, d.h. Glutaminsäure, zurückzukehren. Dasselbe gilt, wenn das DNA-Kodon AAG gewählt wird, das eine Mutation benötigt, um zum DNA-Kodon GAG zurückzukehren, was wiederum für Glutaminsäure kodiert. Wenn zum Beispiel jedoch das DNA-Kodon CGT (das für die basische Aminosäure Arginin (R) kodiert) gewählt wird, sind drei Mutationen notwendig, wenn die DNA-Kodons GAA oder GAG wieder erreicht werden sollen, die für Glutaminsäure kodieren. Daher werden durch die Auswahl des Kodons CGT (für Arginin) zum Ersatz des Kodons für Glutaminsäure mehr Mutationen benötigt, um zum Glutaminsäure DNA-Kodon zurückzukehren und daher wird eine höhere Stabilisierung erreicht.

Daher wird gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die Stabilisierung durch Substitution von Kodons erreicht, die für die Aminosäure in der Region kodieren, vorzugsweise die sauren Aminosäuren in dieser Region, durch Kodons, die mit weniger großer Wahrscheinlichkeit zu einem Kodon mutieren, das für Glutaminsäure kodiert. Die vorliegenden Erfinder haben festgestellt, daß die Gegenwart von Glutaminsäure in der Region aa 293-296 oder einer Region mit derselben Funktionalität, wie z.B. aa 323-328 bei RSV des F-Proteins von Viren, die Attenuierung verringert oder verhindert und die Virulenz verstärkt.

Es gibt in keinem Dokument aus dem Stand der Technik irgendeinen Hinweis, der sich auf diese Entdeckung bezieht. Glutaminsäure, wie auch andere saure Aminosäuren, scheinen zur Virulenz des Virus beizutragen, wenn sie in der Region aa 293-296 oder einer Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, des F-Proteins, lokalisiert sind. Wie oben angegeben, könnte diese Verstärkung der Virulenz mit gleichzeitiger Abschwächung oder Eliminierung der Attenuierung einer Situation zugeschrieben werden, in der hydrophile Regionen benötigt werden, um dem F-Protein eine funktionelle Struktur zu vermitteln, während die Gegenwart von basischen Aminosäuren eine Serinproteasespaltung begünstigen würde.

Daher umfaßt gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die Modifikation in Region aa 293-296 oder einer Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, des F-Proteins von Viren, bevorzugt der Gattung Metapneumovirus, die Substitution von mindestens einer nichtbasischen Aminosäure durch eine basische Aminosäure. Noch bevorzugter werden mindestens zwei nichtbasische Aminosäuren durch basische Aminosäuren ersetzt. Noch bevorzugter werden mindestens drei nichtbasische Aminosäuren durch basische Aminosäuren ersetzt. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die Aminosäuren in der Region aa 293-296 des F-Proteins von hMPV oder APV so modifiziert, daß alle vier Aminosäuren basische Aminosäuren sind.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind alle sechs Aminosäuren der Region aa 323-328 in RSV basische Aminosäuren.

Gemäß einer alternativen bevorzugten Ausführungsform kann die Modifikation die Zugabe von mindestens einer Aminosäure umfassen. Diese Zugabe von mindestens einer Aminosäure kann zusätzlich zu der oben erwähnten Substitution durchgeführt werden. Vorzugsweise betrifft die Zugabe von mindestens einer

Aminosäure die Zugabe von mindestens einer basischen Aminosäure, bevorzugt Arginin, Lysin und/oder Histidin, besonders bevorzugt Arginin oder Lysin.

Gemäß einer weiteren Alternative kann die Modifikation auch die Deletion von mindestens einer Aminosäure umfassen. Vorzugsweise ist diese mindestens eine deletierte Aminosäure eine saure Aminosäure.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Modifikation die Substitution von mindestens einem Glutaminsäurerest durch mindestens eine basische Aminosäure. Die basische Aminosäure wird vorzugsweise ausgewählt aus der folgenden Gruppe, bestehend aus Arginin, Lysin und/oder Histidin. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Arginin und/oder Lysin.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist die Region aa 293-296 des Wildtypvirus eine Sequenz wie dargestellt in einer der SEQ ID NO 24 bis 27 auf.

SEQ ID NO 24 stellt zum Beispiel die Aminosäuren in Region aa 293-296 des Wildtyp APV-A-Stamms Nr. 8544 dar, nämlich

RKEK.

SEQ ID NO 25 stellt zum Beispiel die typischen Aminosäuren in Region aa 293-296 von APV-B-Viren dar, nämlich

RHER.

SEQ ID NO 26 stellt zum Beispiel die typischen Aminosäuren in Stellungen aa 293-296 von Viren des APV-C-Typs dar, nämlich

SGKD.

SEQ ID NO 27 stellt zum Beispiel die Aminosäuren in Stellungen aa 293-296 von menschlichem Metapneumovirus dar, nämlich

SGKK.

Die Bezeichnung "Wildtypvirus", wie verwendet gemäß der vorliegenden Erfindung, betrifft diejenigen Viren, die keine Mutationen in Positionen 293-296 oder einer Region mit derselben Funktionalität (wie z.B. aa 323-328 bei RSV) des F-Proteins aufweisen. Im Regelfall ist ein solches Wildtypvirus ein virulentes Virus. Es ist jedoch auch möglich, ein bereits attenuiertes Lebendvirus als Wildtypvirus der vorliegenden Erfindung zu verwenden, das dann weiter durch die Modifikationen in Stellungen aa 293-296 oder in einer Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, des F-Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung attenuiert wird.

Bevorzugte Viren, die Wildtypviren im Sinne der vorliegenden Erfindung sein können, sind menschliches Metapneumovirus, APV-Virus der Typen A, B, C oder non-A, non-B oder RS-Virus.

Vorzugsweise weist die aa 293-296 Region des attenuierten Virus eine Sequenz auf, wie dargestellt in einer der SEQ ID NO 1 bis 23.

SEQ ID NO 1 bis 23 können auch gewählt werden, um einen Bestandteil der Region aa 323-328 im RS-Virus zu bilden.

SEQ ID NO 1 ist eine beispielhafte Aminosäuresequenz in Stellung aa 293-296, wodurch zum Beispiel ein attenuierter Stamm, der als Impfstoff verwendbar ist, für z.B. Stamm Nr. 8544 (APV-Typ A) bereitgestellt werden kann. Diese SEQ ID NO 1, nämlich

RRRR

könnte zum Beispiel auch ein attenuiertes menschliches Metapneumovirus oder ein attenuiertes APV-Virus vom B- oder C-Typ oder non-A- non-B-Typ bereitstellen.

Durch Modifikation der Aminosäuren oder der Kodons, die für die Aminosäuren kodieren, an Stellungen aa 293-296 oder in einer Region mit derselben Funktionalität, wie z.B. aa 323-328 bei RSV, des F-Proteins wie offenbart gemäß der vorliegenden Erfindung, ist es möglich, ein attenuiertes Lebendvirus bereitzustellen, das als Impfstoff verwendbar ist.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist die Region aa 293-296 des Wildtypvirus die Aminosäuresequenz wie dargestellt in SEQ ID NO 24 auf, wobei die Region des attenuierten Virus eine Sequenz wie dargestellt in SEQ ID NO 1 aufweist. Eine solche Ausführungsform würde ein attenuiertes Lebensvirus für APV-Typ-A, z.B. Stamm Nr. 8544, bereitstellen.

Gemäß einer weiteren spezifisch bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die Region aa 293-296 des Wildtypvirus die in SEQ ID NO 27 dargestellte Sequenz auf, wobei die Region des attenuierten Virus die in SEQ ID NO 1, 2, 10 oder 21 dargestellte Sequenz aufweist. Eine solche Modifikation in Region aa 293-296 würde zum Beispiel ein attenuiertes Lebendvirus für das menschliche Metapneumovirus bereitstellen. Die bevorzugten Sequenzen, wie dargestellt in SEQ ID NO 1 bis 23, können auch ein oder mehrere Histidine als Ersatz für entweder Lysin oder Arginin umfassen. Das Obige ist mutatis mutandis ebenfalls für die Region aa 323-328 von RSV anwendbar.

Wie oben dargestellt, wird die vorliegende Modifikation in Region aa 293-296 oder in einer Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, des F-Proteins zu

einer Bereitstellung von attenuierten Lebendviren z.B. der Gattung Metapneumovirus oder RSV führen, die das gemeinsame Merkmal eines F-Proteins mit einer substantiellen genetischen Homologie zwischen den Sequenzen der jeweiligen F-Proteine bei diesen Viren aufweisen.. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Impfstoff, der gemäß der vorliegenden Erfindung bereitgestellt wird, gegen das menschliche Metapneumovirus wirksam. Weiterhin bevorzugt ist das Metapneumovirus aviäres Metapneumovirus, insbesondere APV.

Die vorliegende Erfindung ist nicht auf Metapneumovirus begrenzt, sondern ist für all diejenigen Viren anwendbar, die eine deutliche genetische Homologie, z.B. mehr als 50 %, vorzugsweise mehr als 65 %, besonders bevorzugt mehr als 75 % Sequenzhomologie, bestimmt basierend auf Sequenzhomologiestudien unter hoch stringenten Bedingungen, im Bereich des F-Proteins mit Mitgliedern der Gattung Metapneumovirus, insbesondere mit APV oder menschlichem Metapneumovirus, aufweisen.

Vorzugsweise wird das attenuierte Lebendvirus mit einem geeigneten Hilfsstoff und/oder Träger und/oder Adjuvans formuliert. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das Virus ein attenuiertes Lebendvirus, das mit einer geeigneten Menge Interleukin-6 (IL-6) formuliert wird. Die Formulierung mit Interleukin-6 wird besonders bevorzugt, wenn das Virus ein aviäres Metapneumovirus ist.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Virus ein attenuiertes Virus und wird mit einer geeigneten Menge Interleukin-12 (IL-12) und/oder Interleukin-18 (IL-18) formuliert. Das attenuierte Virus wird vorzugsweise mit Interleukin-12 und/oder Interleukin-18 formuliert, wenn das Virus ein menschliches Metapneumovirus oder RSV ist.

Die Bezeichnung "eine geeignete Menge" im Kontext der vorliegenden Erfindung bezeichnet eine Menge, die, wenn sie

mit dem attenuierten Virus gemäß der vorliegenden Erfindung formuliert wird, die gewünschte Wirkung bereitstellt, jedoch die Verwendbarkeit des attenuierten Lebendvirus als Impfstoff nicht nachteilig beeinflußt.

Geeignete Mengen können vom Fachmann bestimmt werden und werden von dem verwendeten attenuierten Virus und dem zu behandelnden Subjekt abhängen, z.B. in Hinblick auf Alter, Gewicht, Körperzustand und die zu behandelnde Krankheit.

Ein Verfahren für die Erzeugung eines Impfstoffs gemäß der vorliegenden Erfindung, gerichtet z.B. gegen Mitglieder der Gattung Metapneumovirus, umfaßt die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung eines virulenten Virus, gegen das ein Impfstoff entwickelt werden soll,
- b) Bereitstellung einer Modifikation in der Nucleinsäuresequenz, die für Region aa 293-296 kodiert oder einer Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, des F-Proteins des Virus, und
- c) Erhalt eines attenuierten Lebendvirus, umfassend die obige Modifikation.

Vorzugsweise betrifft die Modifikation eine Modifikation wie oben definiert, insbesondere in den beigefügten Ansprüchen 2 bis 16.

Weiter bevorzugt ist das Virus ein Virus, ausgewählt aus der Gruppe wie oben definiert, insbesondere gemäß den beigefügten Ansprüchen 17 bis 19.

Insbesondere betrifft die in Schritt b) oben genannte Modifikation die Region aa 293-296, wenn APV oder hMPV betroffen ist, und betrifft Region aa 323-328, wenn RSV betroffen ist.

Wiederum wird die Bereitstellung einer Modifikation vorzugsweise wie folgt erhalten:

- i) Herstellung einer Gesamtlängen-DNA-Kopie des viralen Genoms des Virus, gegen das ein Impfstoff entwickelt werden soll,
- ii) Bereitstellung von Kopien von Gesamtlängen-DNA durch Ligation von Teillängen-PCR-Produkten, die eine Veränderung in Region aa 293-296 oder eine Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, einführen,
- iii) Virusrettung von den Gesamtlängen-DNA-Kopien durch Verwendung von z.B. Hühnerpocken-T7-Polymeraserekombinant oder zellulärer ribosomaler pol 1 RNA-Polymerase.

Natürlich sind die spezifischen Verfahren, die verwendet werden um Mutationen an einer spezifischen Stelle in einem Genom einzuführen, dem Fachmann bekannt und/oder die gewöhnlichen Verfahren sind hier anwendbar.

Veränderungen werden in der Fusionsproteinsequenz z.B. durch PCR-Amplifikation durchgeführt, unter Verwendung von Primern, die im Vergleich mit der ursprünglichen Sequenz verändert sind. Die Sequenz von Primern 3,82 Sst neg und 3,82 Sst pos folgen der Ausführungsformsequenz, außer im Hinblick auf die Substitution von agg aaa aag aaa durch agg aga cgc cgc. Zwei PCRs, eine von der Leaderseite bis zu 3,82 Sst neg und die andere von 3,82 Sst pos zu einer Position stromabwärts (Trailerrichtung) werden durchgeführt. Spezifisch wird die PCR von LTZ 3.1Xho+ bis 3,82Sst- (bezeichnet als 3a) die veränderte Sequenz aufweisen (Veränderung von aa, kodierend zu RRRR) und wird außerdem eine Sst11 RE-Stelle enthalten (zusammen mit den benachbarten gg, direkt stromabwärts von

dieser Sequenz, [Sst11 Erkennungsstelle ccgcgg]). Die PCR zwischen den Primern 3,82 Sst11 pos und LTZ 4,6 Sal- (bezeichnet als 3b) erzeugt dieselben Veränderungen in dem benachbarten Fragment, daher, wenn die beiden PCR-Produkte mit Sst11 geschnitten und miteinander ligiert werden, wird das Produkt die ursprüngliche LTZ 3.1Xho+ bis LTZ 4.6 Sal- Sequenz aufweisen, bis auf die oben angegebene Veränderung.

In der Praxis wird 3a zunächst (stumpf) kloniert, dann - nach Überprüfung der Sequenz - wird PCR 3b zugefügt (nachdem sowohl das Plasmid als auch 3b mit Sst11 und Sal1 geschnitten wurden).

Das Verfahren kann auch für sehr viel längere PCRs unter Verwendung derselben Primer (3,82 Sst neg und 3,82 Sst pos) verwendet werden und ihre Ligierung wird DNA ergeben, die Sst11 geschnitten und dann miteinander ligiert werden kann, um direkt für die Virusrettung verwendet zu werden, wodurch irgendwelche Klonierungsstufen vermieden werden. Auf diesem Weg sollte es möglich sein, schnell attenuierte Viren entweder aus Feldisolaten oder RNA-Extrakten zu erzeugen.

Eine bevorzugte Klonierungsstrategie ist in Fig. 2 und Fig. 3 angegeben. Die Genomfragmente wurden ursprünglich in TWF 18 kloniert (LTZ T7 1 bis LTZ 9+10 HDVR). Jeder klonierte Bereich (beginnend mit LTZ T7 1 und endend mit LTZ 9+10 HDVR) wurde mit Xho1 und Sal1 verdaut, dann wurde jeder jeweils sequentiell in CTPE kloniert. Auf jeder Stufe führte die Ligierung der geschnittenen Sal1- (Plasmid) und Xho1- (Leaderende des LTZ-Fragments) Stellen am Leader des Fragments zu der Intronsequenz, die gegen beide Enzyme resistent ist, während eine Kombination von zwei Sal1 geschnittenen Enden am Trailende sicherstellte, daß Sal1 immer noch vorliegen konnte, um in der Lage zu sein, das nächste Fragment zu akzeptieren. Daher, nach Zugabe von jedem Genombereich und darauffolgendes Klonieren, wurde das Plasmid mit Insert Sal1 wieder verdaut und der nächste Bereich

(ausgeschnitten aus TWF mit Xhol und Sal1) wurde hineinkloniert.

Es ist gemäß der vorliegenden Erfindung auch möglich, einen Impfstoff bereitzustellen, der eine Mischung aus zwei oder mehr attenuierten Lebendviren umfaßt, wobei eines oder mehrere der attenuierten Lebendviren gemäß der vorliegenden Erfindung erhalten werden, d.h. eine Modifikation in der Aminosäuresequenz an Stellungen aa 293-296 oder in einer Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, des F-Protein umfassen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein attenuiertes Lebendvirus, das zur Gattung Metapneumovirus oder RSV gehört oder ein Virus, das eine bedeutende genetische Homologie im F-Protein mit Viren der Gattung Metapneumovirus aufweist, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es eine Modifikation in der Region aa 293-296 oder einer Region mit derselben Funktionalität, wie z.B. aa 323-328 bei RSV, des F-Proteins aufweist. Sowohl die Modifikation als auch das Virus sind wie oben definiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Wirtszelle, umfassend ein Virus, das durch Modifikation wie oben beschrieben, attenuiert ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform auch eine DNA- oder cDNA-Sequenz, wie definiert in einer der SEQ ID NO 28 bis 34. Alle diese Sequenzen 28 bis 34 sind Gesamtlängen-Sequenzen des F-Proteins von menschlichem Metapneumovirus, umfassend eine geeignete Modifikation in Region aa 293-296, die ein attenuiertes menschliches Lebend-Metapneumovirus bereitstellen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch RNA-Sequenzen, korrespondierend zu den DNA-Sequenzen wie definiert in SEQ ID NO 28 bis 34.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen Vektor wie auch ein Plasmid, umfassend die DNA-, cDNA oder RNA-Sequenz wie oben definiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein attenuiertes Lebendvirus, das durch das Verfahren wie oben beschrieben erhältlich ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein F-Protein eines Mitglieds der Gattung Metapneumovirus oder RSV oder eines Virus, das eine bedeutende genetische Homologie im F-Proteinbereich mit einem Mitglied der Gattung Metapneumovirus teilt, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Modifikation oder Modifikationen wie oben definiert umfaßt, d.h. eine Modifikation (Modifikationen) der Aminosäuren an den Positionen 293-296 oder in einer Region mit derselben Funktionalität, wie z.B. aa 323-328 bei RSV. Die Modifikation (Modifikationen), die im F-Protein gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten sein können, sind oben definiert.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung des F-Proteins wie oben definiert oder eines attenuierten Lebendvirus wie oben definiert für die Herstellung eines Impfstoffs zur Verhinderung einer Störung oder Erkrankung, ausgelöst durch ein Virus wie oben definiert.

Insbesondere kann das F-Protein oder das attenuierte Lebendvirus der vorliegenden Erfindung für die Herstellung eines Impfstoffs zur Verhinderung einer Störung oder Krankheit verwendet werden, die durch einen der folgenden Viren ausgelöst wird:

- APV Typ A, B, C oder non-A, non-B
- humanes Metapneumovirus
- RS-Virus.

Im weiteren wird die Erfindung gemäß den Beispielen unten beschrieben werden.

Die Beispiele sollen die vorliegende Erfindung nur weiter beschreiben, ohne den Umfang der Erfindung auf die spezifischen Beispiele zu begrenzen.

### Beispiele

#### 1. Herstellung einer Gesamtlängen-DNA-Kopie eines viralen Genoms

RNA wurde aus einem in Verozellen vervielfältigen APV-Stamm LTZ 1 (deutsches Feldisolat; gesammelt von LTZ) unter Verwendung des Qiagen Rneasy Kits (Qiagen Ltd., Crawley, UK) extrahiert. Die RNA wurde revers transkribiert (Superskript II reverse Transkriptase (Invitrogen Ltd., Paisley, UK)), bei 42°C, 1,5 Std. von einem viralen Leader unter Verwendung der Primer APV-Lead (5'CGAGAAAAAAACGCATTCAAGCAGG3') (SEQ ID NO 35) und M2Start+ (5'GATGTCTAGGCGAAATCCCTGC 3') (SEQ ID NO 36), und die cDNA der Leader- und Trailerbereiche wurde in zwei 12-Zyklus PCRs (94°C 5s, 60°C 20s, 68°C 6 Min. [ansteigend 30s pro Zyklus nach Zyklus 5] 11 mal wiederholt, mit Bio-X-Act DNA-Polymerase (Bioline, London, UK)) amplifiziert. Die Leaderbereich PCR verwendete die APV-Lead geprimte RT-Reaktion als Matrize und PCR-Primer waren APV-Lead ext (5'ACGAGAAAAAAACGCATTCAAGCAGGTTCT3') (SEQ ID NO 37) und LTZ 8,2 sal neg (5'GGGTATCTATGATGGTCGACAGATGTG3') (SEQ ID NO 38). Der Trailerbereich verwendete M2Start+ geprimte RT-Reaktion als Matrize und PCR-Primer waren LT7 (5'TTAATACGACTCACTATAAGGACCAATATGGAAATATCCGATGAG3') (SEQ ID NO 39) und APV trail ext (5'GCTAAAAATTGATGAATACGGTTTTCTCGT3') (SEQ ID NO 40). Die 2

PCRs wirkten als Matrizen für weitere 30 Zyklen PCRs (94°C 5s, 60°C 20s, 68°C 2 Min. [ansteigend 10s pro Zyklus nach Zyklus 5], 29 mal wiederholt) unter Verwendung von pfu (Stratagene, Amsterdam, NL), was das Gesamtgenom in 8 Bereichen amplifizierte, bezeichnet als LTZ 1 bis 10. PCR-Primer beinhalteten die Sequenzmodifikationen, die Restriktionsendonuclease-Erkennungsstellen oder andere Veränderungen an DNA-Extremitäten und 3'-Extremitäten einführten, während, mit Ausnahme von LTZ 3, die kodierte Proteinsequenz unverändert blieb. Der T7 Promoter wurde der viralen Leadersequenz in LTZ 1T7 zugefügt, eine verkürzte Form des menschlichen RNA-Polymerase-1-Promoters (pol 1) wurde der viralen Leadersequenz in LTZ 1 pol zugefügt, der Bereich, der für aa 293-296 des Fusionsproteins kodierte, wurde so verändert, daß aa RKKK RRRR in LTZ 3 wurde und in LTZ 10 HDVR wurde das Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym dem viralen Trailerbereich (LTZ 9+10) zugefügt. Die Veränderungen in der F-Proteingensequenz erhöhten die Anzahl der Mutationen, die benötigt wurden, damit die Sequenz zu einer Sequenz mutieren konnte, die für saure Aminosäuren kodierte, wie detailliert dargestellt in Figur 4.

Tabelle 2

Sequenz der PCR-Primer, die verwendet wurden, um Sal1/Xhol flankierte Genombereiche zu erzeugen

LTZ-Be-reich	Primer	Sequence 5'-3'	SEQ ID NO
T7 1	T7 APV lead 1	TAA TACGACTCACTATAGGACGAGAAAAAAACGCATTCAAGCAGG	41
	LTZ 1.1 sal-	CTC AAG GTT GGG GGG TCG ACC	42
Pol 1	pol 1 start+	ACG GGC CGG CCC CCT GCG TG	43
	Lead Sap 1	AAAAGCTCTTCAATTACGAGAAAAAAACGCATTCAAGCAGGTTTC	44
	LTZ 1.1 sal-	CTC AAG GTT GGG GGG TCG ACC	45
2	LTZ 1.1 Xho+	GGC ATG TAC AAA GCT CGA GCC C	46
	LTZ 3.1 sal-	CAT TGC AAG TGA TGT TGT CGA CAT TCC C	47
3	LTZ 3.1 Xho+	CCT CGA AAT AGG GAA TCT CGA GAA CAT CAC	48
	F 3.82 Sst-	CAA GCA TAA TTG CCG CGG CGT CTC CTA CAG AGTGG	49
	F 3.82 Sst+	CCA CTC TGT AGG AGACGC CGC GGC AAT TAT GCT TG	50
	LTZ 4.6 sal-	GCA GGG ATT TCG CGT GGA CAT CTT C	51
4+5	LTZ 4.6 Xho+	CAA GTG AAG ATC TCG AGG CGA AAT CCC	52
	LTZ 7.6 sal-	GAT CGT ATT CAA CTC GAG AAC TTA CCT GAC	53
6+7	LTZ 7.6 Xho+	GAT CGT ATT CAA CTC GAG AAC TTA CCT GAC	54
	LTZ 9.9 sal-	GCT ATG ATC TTT TGC GTC GAC AAA GCA C	55
8	LTZ 9.9 Xho+	GTA CAT CCA GTG CTT TCT CGA GGC	56
	LTZ11.9 sal-	CAG TGA CAG GTT TTT GGT CGA CTA TG	57
9+10	LTZ11.9 Xho+	GCT GAG GGT GAC ATA CTC GAG C	58
HDVR	HDVR Xho-	GCA GCC GGA CTC GAG CTC TCC C	59

Mit Ausnahme von LTZ 3 wurde jedes stumpfendige PCR-Produkt in das zweckkonstruierte Plasmid pTWF 18 ligiert, das ein pUC 18 abgeleitetes Plasmid war, bei dem die Sal1-Stelle zu EcoR1 verändert worden war. Das Plasmid wurde kopiert und

verändert unter Verwendung eines modifizierenden Primers (p18-eco420- 5' TAG AAT TCA CCT GCA GGC ATG C3' (SEQ ID NO 60) in einer auf pfu basierenden PCR (Zyklus 94°C 5s, 60°C 20s, 68°C 3 Min. [ansteigend 10s pro Zyklus nach Zyklus 5] 29 mal wiederholt), einem anderen Primer p18-400+ 5' GAG GAT CCC CGG GTA CCG AGC3' (SEQ ID NO 61). Die PCR-Produkte wurden über Nacht selbst ligiert (Bioline QS Ligase, über Nacht 14°C) und dann verwendet, um kompetente DH5alpha Zellen (Invitrogen) unter Standardbedingungen (LB Agar/Broth, Xgal-Platten, Ampicillin 100 µg/ml, 37°C) zu transformieren. Blaue Kolonien wurden selektiert und ein spezifischer Restriktionsendonucleaseverdau wurde durchgeführt, um zu bestätigen, daß zwei EcoR1-Stellen vorlagen und daß die Sall-Stelle entfernt worden war.

Die LTZ-Bereiche (außer T71 und 3) wurden in die smal-Stelle von pTWF18 (Bioline QS Ligase, über Nacht 14°C) ligiert. Die Ligationsmischungen wurden verwendet, um kompetente DH5alpha Zellen zu transformieren. Die gesamte Kultivierungsarbeit der Bakterien mit Plasmiden, die die LTZ-Genome oder Teile davon enthielten, wurden bei 30°C durchgeführt aufgrund von Stabilitätsüberlegungen. LTZ 3 wurde in pUC 18 in zwei Hälften kloniert. Die 5'-Hälfte (3a, Antigenomsinn) wurde amplifiziert und modifiziert unter Verwendung der Primer LTZ 3.1 Xho+ und F 3.82 Sst neg (siehe Tabelle 2) in einer PCR von 30 Zyklen (94°C 5s, 45°C 20s, 68°C 2 Min. [ansteigend 10s pro Zyklus nach Zyklus 5] 29 mal wiederholt) unter Verwendung von pfu-Polymerase. Dies wurde in die Smal-Stelle von pUC18 ligiert und in DH5alpha kloniert (pUC18-3a). Die Orientierung wurde unter Verwendung eines Sst11, EcoR1 Doppelverdaus überprüft. Die 3'-Hälfte (3b) wurde unter Verwendung der Primer F 3.82 Sst pos und LTZ 4.6 sal- (siehe Tabelle 2) unter Verwendung eines Zyklus von 94°C 5s, 50°C 20s, 68°C 2 Min. [ansteigend 10s pro Zyklus nach Zyklus 5] 29 mal wiederholt, unter Verwendung der pfu-Polymerase amplifiziert. Diese wurde mit Sst11 und Sall geschnitten und in Sst11 und Sall geschnittenes pUC18-3a (Bioline QS Ligase) ligiert. Die

resultierende Ligationsmischung wurde verwendet, um DH5alpha zu transformieren und die resultierenden Klone wurden pLTZ 3 RRRR benannt.

Alle klonierten LTZ-Bereiche wurden sequenziert (Imperial College Medical School Service) und, wenn Mutationen vorlagen, wurde der Bereich rekloniert, außer die Proteinsequenz war nicht betroffen.

Das low copy Plasmid pCTPE war eine Modifikation von pOLTV5 (Peeters et al (1999), J. Virol. 23, 5001-5009), worin die Klonierungseffizienz durch Entfernung von HDVR, T7-Terminator und dem restlichen teilweisen lac z Genombereichen unter Verwendung eines ähnlichen Ansatzes wie dem, der verwendet wurde, um pTWF18 zu erzeugen, verstärkt wurde. In diesem Fall waren beide PCR-Primer modifizierend (V5 630BE+ 5' CGG ATA TCC ACA GGA TCC GGG GAT AAC GC3' (SEQ ID NO 62) und V5 190 Bam- 5' CGA GAT CCT CGA GCC GGA TCC TC3' (SEQ ID NO 63) und führten neue EcoRV stumpfendige Stellen ein, flankiert auf jeder Seite von BamH1-Stellen. Alle Wachstumsmedien enthielten Kanamycin mit 15 µg/ml (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK).

Das PCR-Produkt LTZ T71 wurde in die EcoRV-Stelle von pCTPE kloniert, wodurch pCTPE-LTZT71 erzeugt wurde und die Gesamtsequenz des Inserts wurde bestätigt. Es wurde dann mit Sall verdaut, worin LTZ2, ausgeschnitten aus pTWF18 (Xhol Sall Doppelverdau) ligiert und kloniert wurde (DH5alpha (Invitrogen), Kanamycinplatten und -broth). Die Orientierung wurde durch Vergleich eines BamH1 Verdaus mit einem BamH1, Sall Doppelverdau überprüft. Das Plasmid mit dem korrekt orientierten Insert (pCTPE-LTZT71,2) wurde nur mit Sall geschnitten und dazu wurde Xhol und Sall verdautes LTZ 3 RRRR hinzugefügt und wie vorher ligiert. Das Verfahren wurde in ähnlicher Weise vom 5'-Ende fortgeführt (Antigenomsinn), bis das Gesamtgenom, zusammen mit dem T7-Promoter und HDVR,

kloniert worden war (pCTPE-LTZT7, 1, 2, 3RRRR, 4+5, 6+7, 8, 9+10-HDVR, besser pLTZ f1T7 oder pLTZf1pol1).

## 2. Trägerproteine

Nucleocapsid- (N), Phospho- (P) und Matrix 2- (M2) -Sequenzen von Stamm LTZ1 wurden kopiert und kloniert. Die RNA wurde extrahiert (Rnease, Qiagen), die dann revers transkribiert und durch RT-PCR amplifiziert wurde (Superskript 2 Invitrogen; BioX-Act, Bioline; Zyklus von 94°C 5s, 50°C 20s, 68°C 2 Min. [ansteigend 10s pro Zyklus nach Zyklus 5], wiederholt 29 mal) unter Verwendung von Primern (siehe unten), die die T7-Promotersequenz direkt vor dem Startkodon von jedem Gen einführte und über jedes Stopkodon hinaus fortließ.

**Tabelle 3**  
**Sequenz von PCR-Primern, die verwendet wurden, um das**  
**Trägerproteingen zu vervielfältigen**

Gen	Primer	Sequence 5'-3'	SEQ ID NO
N	T7-N	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG ACA AGT CAA	64
	TGT	CTC TTG	
N	start+	GTC AAA ATG TCT CTT GAA AG	65
P	Pstart-	CAG GGA AAG ACA TTG TTA C	66
P	T7-P	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG ACA AGT AAC AAT GTC TTT CC	67
	Pstart+	GTA ACA ATG TCT TTC CCT G	68
	Pstop neg ext	GAC TTG TCC CAT TTT TTC ATA ACT ACA GAT CAA G	69
M2	T7-M2	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG ACA AGT GAA GAT GTC TAG	70
	M2start +	GAT GTC TAG GCG AAA TCC C	71
	M2-1 <sup>st</sup> neg	GCA TTG CAC TTA ATT ATT GCT GTC ACC C	72
L	T7-L	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGA CCA ATA TGG AAA TAT CCG ATG AGT C	73
	L start Xho+	GAA TGA AAA ACA AGG ACC AAT ATG GAA ATA TCC GAT GAG	74

T7 vorfixierte Gene wurden in die smal-Stelle von pUC18 kloniert unter Verwendung einer Verfahrensweise, die zu der für TWF oben verwendeten identisch war. PCR-Produkte ohne T7-Promoter wurden in die smal-Stelle von pTarget (Säugerexpressionsvektor, Promega, Southhampton, UK) kloniert.

Das virale Polymerasegen (L) wurde in Bereichen in die EcoRV-Stelle von pCTPE unter Verwendung des sequentiellen Ansatzes, der für das komplette virale Genom verwendet wurde, kloniert. In der Reihenfolge wurden T7 L start, LTZ 6+7, LTZ8, LTZ 9+10 in pCTPE ligiert. LTZ T7 L start war ein PCR-Produkt (30 Zyklen 94°C 5s, 60°C 20s, 68°C 2 Min. [ansteigend 10s pro Zyklus nach Zyklus 5]) wiederholt 29 mal unter Verwendung von Pfu [Stratagene]), hergestellt aus der oben beschriebenen 12 Zyklus Trailer PCR unter Verwendung der Primer T7-L (Tabelle 3) und LTZ 7.6Xho- (Tabelle 2). LTZ T7start wurde in die CTPE EcoRV-Stelle ligiert; während folgende Bereiche von pTWF18 (SalI und Xho1) geschnitten und in die neue einzigartige SalI-Stelle ligiert wurden, die in jeder Stufe der Klonierung eingeführt wurde. Die Orientierung wurde wie bei dem Volllängengenom überprüft.

Das L-Gen wurde ebenfalls in pTarget in ähnlicher Weise wie der für die Startersequenz beschriebenen kloniert (erzeugt unter Verwendung der Primer L Start Xho+ (Tabelle 2) und LTZ 7.6Xho- (Tabelle 2)) und diesem war kein T7-Promoter vorgeschaltet.

### 3. Gesamtlängenkopie durch PCR-Kopie

Das gesamte Genom, mit einem vorgeschalteten T7-Promoter, wurde kopiert und in 3 PCRs vervielfältigt (Bioline Bio-X-act, 30 Zyklen 94°C 5s, 60°C 20s, 68°C 4 Min. [ansteigend 10s pro Zyklus nach Zyklus 5]) unter Verwendung von low copy (12x) PCRs, die vorher als Matrizen erwähnt wurden. Die Leader- und Zentralbereiche verwendeten das APV

lead ext und LTZ 8.2 sal Produkt und der Trailerbereich verwendete das LT7 und APV trail ext Produkt.

Die verwendeten Primer waren die folgenden: Leaderbereich, T7-APV lead 1 und F 3.82 sst pos (5' CCA CTC TGT AGG AGA CGC CGC GGC AAT TAT GCT TG3') (SEQ ID NO 75); Zentralbereich F 3.82 sst neg (5' CAA GCA TAA TTG CCG CGG CGT CTC CTA CAG AGT GG3') (SEQ ID NO 76) und LTZ 8.2 Sal- und der Trailerbereich verwendete LTZ 8.2 Xho+ und APV trail ext. Auf diese Weise wurden die Restriktionsendonucleasestellen von SstII) und Xho/Sal an Verbindungsberichen 3826-3831 bzw. 8204-8209 zugefügt, um eine spätere Ligation der drei Bereiche zu ermöglichen, und es wurde weiterhin eine Veränderung der Proteinkodierung zu RRRR in F-Gen an den aa-Stellungen 293-296 eingeführt. Die Bereiche wurden mit SstII geschnitten (Leaderbereich), SstII und Sal1 (Zentralbereich) und Xhol (Trailerbereich) und unter Verwendung von hoch konzentrierter T4 DNA-Ligase verbunden (über Nacht, Fermentas, Deutschland, 30 U/ $\mu$ l).

#### 4. Virusrettung

##### a) unter Verwendung von Hühnerpocken-T7-Polymeraserekombinant

Verozellen (70 % konfluent) in 35 mm Vertiefungen wurde einmal mit 1,0 ml Optimem 1 gewaschen, dann mit Hühnerpocken-T7-Polymeraserekombinant mit einer MOI von 0,2 infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Std. wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit 1 ml Optimem 1, dann mit 2 ml gewaschen.

MEM (5 %) FCS wurde zugefügt. DNA/Fugene 6 (Boehringer Mannheim, Lewes, UK) Komplex wurde durch Vermischen von 4 klonierten Trägerproteingenen N, P, M2 in pUC18 (jeweils 0,5  $\mu$ g), L in pTWF18 (50 ng), Vollängengenom (1  $\mu$ g entweder in pCPTE kloniert oder als ligiertes PCR-Produkt) und 10  $\mu$ l

Fugene6 (Boehringer Mannheim) hergestellt und gelöst in 300 µl dMEM. Nach einem vollständigen Vermischen wurde diese Mischung tröpfchenweise auf Zellen unter vorsichtigem Schütteln hinzugefügt.

Fünf Tage später wurde der Überstand gesammelt, durch einen 0,2 µm Filter geführt und verwendet, um frische Verozellen zu inokulieren. CPE wurde beobachtet und die Zellen wurden auf Gegenwart von TRT-Antigen unter Verwendung von indirektem Immunofluoreszenzfärben gefärbt. Es wurde bestätigt, daß das Virus von der hergestellten Vollängenkopie abstammte, indem PCR-Kopien von den einzigartigen RRRR-Regionen des F-Gens und anderen Sal1/Xhol Verbindungsregionen sequenziert wurden.

b) unter Verwendung von zellulärer ribosomaler pol1 RNA-Polymerase

Verozellen (70 % konfluent) oder CEFs in 35 mm Vertiefungen wurden einmal mit 1,0 ml Optimem 1 gewaschen; dann wurden 2 ml MEM (5 %) FCS zugefügt. Der DNA/Fugene 6 (Boehringer Mannheim) Komplex wurde hergestellt, indem die vier klonierten Trägerproteingene N, P, M2 (jeweils 0,5 µg), L (50 µg) in pTarget, pol1 Vollängengenom (1 µg, kloniert in pCPTE) und 10 µl Fugene 6 (Boehringer Mannheim) gemischt und in 300 µl dMEM gelöst wurden. Nach einem vollständigen Vermischen wurde diese Mischung tröpfchenweise auf Zellen unter vorsichtigem Schütteln zugefügt.

Fünf Tage später wurden die Zellen gefriergetrocknet und die geklärten Überstände wurden verwendet, um frische Zellen zu infizieren. CPE wurde beobachtet und die Zellen wurden im Hinblick auf die Gegenwart von TRT-Antigen unter Verwendung von indirekter Immunofluoreszenzfärbung gefärbt. Es wurde bestätigt, daß das Virus von der hergestellten Vollängenkopie abstammte, indem die PCR-Kopien von den einzigartigen RRRR-Regionen des F-Gens und Sal1/Xhol Bindungsregionen sequenziert wurden.

Sequenzen - Überblick

Seq ID NO

Modifizierte aa 293-296

1:  
RRRR2:  
RRRK3:  
RRKK4:  
RKKK5:  
KKKK6:  
KKKR7:  
KKRR8:  
KRRR9:  
SKKK10:  
SRRR11:  
SKKR12:  
SKRR13:  
SRRK14:  
SRKR15:  
SKRK16:  
KGKK

17:  
KGRR

18:  
KGRK

19:  
KGKR

20:  
RGKK

21:  
RGRR

22:  
RGRK

23:  
RGKR

---

**WILD-TYP aa 293-296 APV und hMPV**

24:  
RKEK

25:  
RHER

26:  
SGKD

27:  
SGKK

---

**F-Protein von hMPV mit modifizierten aa 293-296**

28:  
MSWKVIIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWTNVFTLEVGDVENLTC  
ADGPSLIKTELDLTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTA  
GVAIAKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKN  
KCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQ  
IKLMLENRAMVRRKGFGFLIGVYGSIVIMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCRRRRGNYA  
CLLRDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYP  
CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGNSNRVGIICKQLNKGCSYITNQDADTVTI  
DNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI  
LSSAEKGNTGFIIVIIILIAVLGSTMILVSFIIKKPTGAPP else GVTNNNGFIPH

29:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWTNVFTLEVDVENLTC  
ADGPSLIKTELDLTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTA  
GVAIAKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNNGVRVLATAVRELKDFVKNLTRAINKN  
KCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVRQFSDNAGITPAISLDMTDALARAVSNMPTSAGQ  
IKMLLENRAMVRRKGFGFLIGVYGSIVIMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCRRKGNYA  
CLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCTERGDHVFCDTAAGINVAEKSKECNINISTTNYP  
CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGNSNRGIICKQLNKGSYITNQDADTVTI  
DNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI  
LSSAEKGNTGFIIVIIILIAVLGSTMILVSFIIKKTKPTGAPP else GVTNNNGFIPH

30:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWTNVFTLEVDVENLTC  
ADGPSLIKTELDLTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTA  
GVAIAKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNNGVRVLATAVRELKDFVKNLTRAINKN  
KCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVRQFSDNAGITPAISLDMTDALARAVSNMPTSAGQ  
IKMLLENRAMVRRKGFGFLIGVYGSIVIMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCRRKGNYA  
CLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCTERGDHVFCDTAAGINVAEKSKECNINISTTNYP  
CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGNSNRGIICKQLNKGSYITNQDADTVTI  
DNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI  
LSSAEKGNTGFIIVIIILIAVLGSTMILVSFIIKKTKPTGAPP else GVTNNNGFIPH

31:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWTNVFTLEVDVENLTC  
ADGPSLIKTELDLTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTA  
GVAIAKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNNGVRVLATAVRELKDFVKNLTRAINKN  
KCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVRQFSDNAGITPAISLDMTDALARAVSNMPTSAGQ  
IKMLLENRAMVRRKGFGFLIGVYGSIVIMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCRRKGNYA  
CLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCTERGDHVFCDTAAGINVAEKSKECNINISTTNYP  
CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGNSNRGIICKQLNKGSYITNQDADTVTI  
DNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI  
LSSAEKGNTGFIIVIIILIAVLGSTMILVSFIIKKTKPTGAPP else GVTNNNGFIPH

32:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWTNVFTLEVDVENLTC  
ADGPSLIKTELDLTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTA  
GVAIAKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNNGVRVLATAVRELKDFVKNLTRAINKN  
KCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVRQFSDNAGITPAISLDMTDALARAVSNMPTSAGQ  
IKMLLENRAMVRRKGFGFLIGVYGSIVIMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCRRKGNYA  
CLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCTERGDHVFCDTAAGINVAEKSKECNINISTTNYP  
CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGNSNRGIICKQLNKGSYITNQDADTVTI  
DNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI  
LSSAEKGNTGFIIVIIILIAVLGSTMILVSFIIKKTKPTGAPP else GVTNNNGFIPH

33:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWTNVFTLEVDVENLTC  
ADGPSLIKTELDLTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTA  
GVAIAKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNNGVRVLATAVRELKDFVKNLTRAINKN  
KCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVRQFSDNAGITPAISLDMTDALARAVSNMPTSAGQ  
IKMLLENRAMVRRKGFGFLIGVYGSIVIMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCRRKGNYA

CLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYP  
 CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVIICKQLNKGCYITNQDADTVTI  
 DNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPSSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI  
 LSSAEKGNTGFIIVIIILIAVLGSTMILVSFIIKKTKPTGAPPELSGVTNNGFIPH

34:

MSWKVIIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVNLTC  
 ADGPSLIKTELDLTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRVFLGAIALGVATAAAVTA  
 GVAIAKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNGVRVLATARELKDFVSKNLTRAINKN  
 KCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQ  
 IKLMLENRAMVRRKGFGFLIGVYGSIVYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCRGRGNYA  
 CLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYP  
 CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVIICKQLNKGCYITNQDADTVTI  
 DNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPSSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI  
 LSSAEKGNTGFIIVIIILIAVLGSTMILVSFIIKKTKPTGAPPELSGVTNNGFIPH

**PRIMER**

35:

APV lead

CGAGAAAAAAACGCATTCAAGCAGG

36:

M2start+

GATGTCTAGGGCAAATCCCTGC

37:

APV lead ext

ACGAGAAAAAAACGCATTCAAGCAGGTTCT

38:

LTZ 8.2 sal neg

GGGTATCTATGATGGTCGACAGATGTG

39:

LT7

TTAACGACTCACTATAGGACCAATATGAAATATCCGATGAG

40:

APV trail ext

GCTAAAATTTGATGAATACGGTTTTCTCGT

41:

T7 APV lead1

TAATACGACTCACTATAGGACGAGAAAAAAACGCATTCAAGCAGG

42:

LTZ 1.1 sal -

CTCAAGGTTGGGGGTCGACC

43:  
pol 1 start+  
ACGGGCCGGCCCCCTGCGTG

44:  
Lead Sap 1  
AAAAGCTTCAATTACGAGAAAAAAACGCATTCAAGCAGGTT

45:  
LTZ 1.1 sal -  
CTCAAGGTTGGGGGTGACCC

46:  
LTZ 1.1 Xho+  
GGCATGTACAAAGCTCGAGCCC

47:  
LTZ 3.1 sal -  
CATTGCAAGTGTGTCGACATTCCC

48:  
LTZ 3.1 Xho+  
CCTCGAAATAGGGAATCTCGAGAACATCAC

49:  
F 3.82 Sst-  
CAAGCATAATTGCCGCGCGTCTCCTACAGAGTGG

50:  
F 3.82 Sst+  
CCACTCTGTAGGAGACGCCGCGCAATTATGCTTG

51:  
LTZ 4.6 sal -  
GCAGGGATTCGCGTGGACATCTTC

52:  
LTZ 4.6 Xho+  
CAAGTGAAGATCTCGAGGCGAAATCCC

53:  
LTZ 7.6 sal-  
GATCGTATTCAACTCGAGAACTTACCTGAC

54:  
LTZ 7.6 Xho+  
GATCGTATTCAACTCGAGAACTTACCTGAC

55:  
LTZ 9.9 sal-  
GCTATGATCTTGGCGTGCACAAAGCAC

56:  
LTZ 9.9 xho+

GTACATCCAGTGCTTCTCGAGGC

57:

LTZ11.9 sal-  
CAGTGACAGGTTTGGTCGACTATG

58:

LTZ11.9 xho+  
GCTGAGGGTGACATACTCGAGC

59:

HDVR Xho-  
GCAGCCGGACTCGAGCTCTCCC

60:

p18-eco420-  
TAGAATTCACCTGCAGGCATGC

61:

p18-400+  
GAGGATCCCCGGGTACCGAGC.

62:

V5 630BE+  
CGGATATCCACAGGATCCGGGATAACGC

63:

V5 190 Bam-  
CGAGATCCTCGAGCCGGATCCTC

64:

T7-N  
TTAATACGACTCACTATAGGGACAAGTAAAAATGTCTTTG

65:

N start+

GTCAAAATGTCTCTTGAAAG

66:

Pstart-

CAGGGAAAGACATTGTTAC

67:

T7-P

TTAATACGACTCACTATAAGGACAAGTAACAATGTCTTC

68:

Pstart +

GTAACAATGTCTTC

69:

Pstop neg ext

GACTTGTCCCATTTCATAACTACAGATCAAG

70:

T7-M2

TTAATACGACTCACTATAAGGACAAGTGAAGATGTCTAG

71:

M2start+

GATGTCTAGGCGAAATCCC

72:

M2-1<sup>st</sup>neg

GCATTGCACTTAATTATTGCTGTCACCC

73:

T7-L

TTAATACGACTCACTATAAGGACCAATATGGAAATATCCGATGAGTC

74:

L start Xho+

GAATGAAAACAAGCACCAATATGGAAATATCCGATGAG

75:

F3.82sstpos

CCACTCTGTAGGAGACGCCGCGCAATTATGCTTG

76:

F3.82sstneg

CAAGCATAATTGCCGC GGCGTCT CCTACAGAGTGG

---

Wildtyp aa 323 - 328 von RSV

77:

Human RSV F 323-328

TTNTKE

78:

human RSV F 323-328

TTNIKE

79:

Bovine RSV F 323-328

TTDNKE

**Patentansprüche**

1. Impfstoff gegen ein Mitglied der Gattung Metapneumovirus oder RSV oder ein Virus, das eine bedeutsame genetische Homologie mit einem Mitglied der Gattung Metapneumovirus im Bereich des F-Proteins aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Virus oder einen Teil eines Virus umfaßt, wobei das Virus in Region aa 293-296 der Aminosäuresequenz des F-Proteins (Fusionsprotein) oder in einer Region mit derselben Funktionalität, wie z.B. aa 323-328 bei RSV, im Vergleich zum Wildtypvirus modifiziert ist.
2. Impfstoff gemäß Anspruch 1, wobei das Virus ein Lebendvirus ist.
3. Impfstoff gemäß Anspruch 1, wobei das Virus ein attenuiertes Lebendvirus ist.
4. Impfstoff gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Modifikation eine Stabilisierung der Region aa 293-296 oder einer Region mit derselben Funktionalität wie aa 323-328 bei RSV umfaßt.
5. Impfstoff gemäß Anspruch 4, wobei die Stabilisierung durch Substitution von Kodons erreicht wird, die für die Aminosäuren in der Region kodieren, durch Kodons, die mehr Mutationen benötigen, um zum Wildtypvirus zurückzukehren.
6. Impfstoff gemäß Anspruch 4 oder 5, wobei die Stabilisierung durch Substitution von Kodons, die für Aminosäuren in der Region kodieren, durch Kodons erreicht wird, die mit geringerer Wahrscheinlichkeit zu einem Kodon zurückmutieren, das für Glutaminsäure kodiert.

7. Impfstoff gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei die Modifikation in der Region aa 293-296 oder einer Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, die Substitution von mindestens einer nichtbasischen Aminosäuren durch mindestens eine basische Aminosäure umfaßt.
8. Impfstoff gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei die Modifikation das Hinzufügen von mindestens einer Aminosäure umfaßt.
9. Impfstoff gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche 1 bis 7, wobei die Modifikation die Deletion von mindestens einer sauren Aminosäure umfaßt.
10. Impfstoff gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche 1 bis 8, wobei die Modifikation die Substitution von mindestens einem Glutaminsäurerest durch mindestens eine basische Aminosäure umfaßt.
11. Impfstoff gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine basische Aminosäure ausgewählt ist aus der folgenden Gruppe Arginin, Lysin und/oder Histidin.
12. Impfstoff gemäß Anspruch 11, wobei die mindestens eine basische Aminosäure Arginin und/oder Lysin ist.
13. Impfstoff gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei die Region aa 293-296 des Wildtypvirus eine Sequenz hat wie dargestellt in einer der SEQ ID NO 24 bis 27.
14. Impfstoff gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei die Region aa 293-296 des attenuierten Virus eine Sequenz aufweist wie dargestellt in einer der SEQ ID NO 1 bis 23.

15. Impfstoff gemäß Anspruch 13 und/oder 14, wobei die Region aa 293-296 des Wildtypvirus eine Sequenz wie dargestellt in SEQ ID NO 24 aufweist und wobei die Region des attenuierten Virus eine Sequenz wie dargestellt in SEQ ID NO 1 aufweist.
16. Impfstoff gemäß einem der Ansprüche 13 und/oder 14, wobei die Region aa 293-296 des Wildtypvirus eine Sequenz wie dargestellt in SEQ ID NO 27 aufweist und wobei diese Region des attenuierten Virus eine Sequenz wie dargestellt in SEQ ID NO 1, 2, 10 oder 21 aufweist.
17. Impfstoff gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei eine Modifikation in Region aa 293-296 gewählt wird, um einen Impfstoff gegen APV oder hMPV bereitzustellen, während eine Modifikation in Region aa 323-328 gewählt wird, um einen Impfstoff gegen RSV bereitzustellen.
18. Impfstoff gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17, wobei das Metapneumovirus menschliches Metapneumovirus ist.
19. Impfstoff gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17, wobei das Metapneumovirus aviäres Metapneumovirus ist, insbesondere APV.
20. Impfstoff gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei das attenuierte Lebendvirus mit einem geeigneten Hilfsstoff und/oder Träger und/oder Adjuvans formuliert ist.
21. Impfstoff gemäß Anspruch 20, wobei das Virus ein attenuiertes Virus ist und wobei es mit einer geeigneten Menge Interleukin-6 (IL-6) formuliert wird.

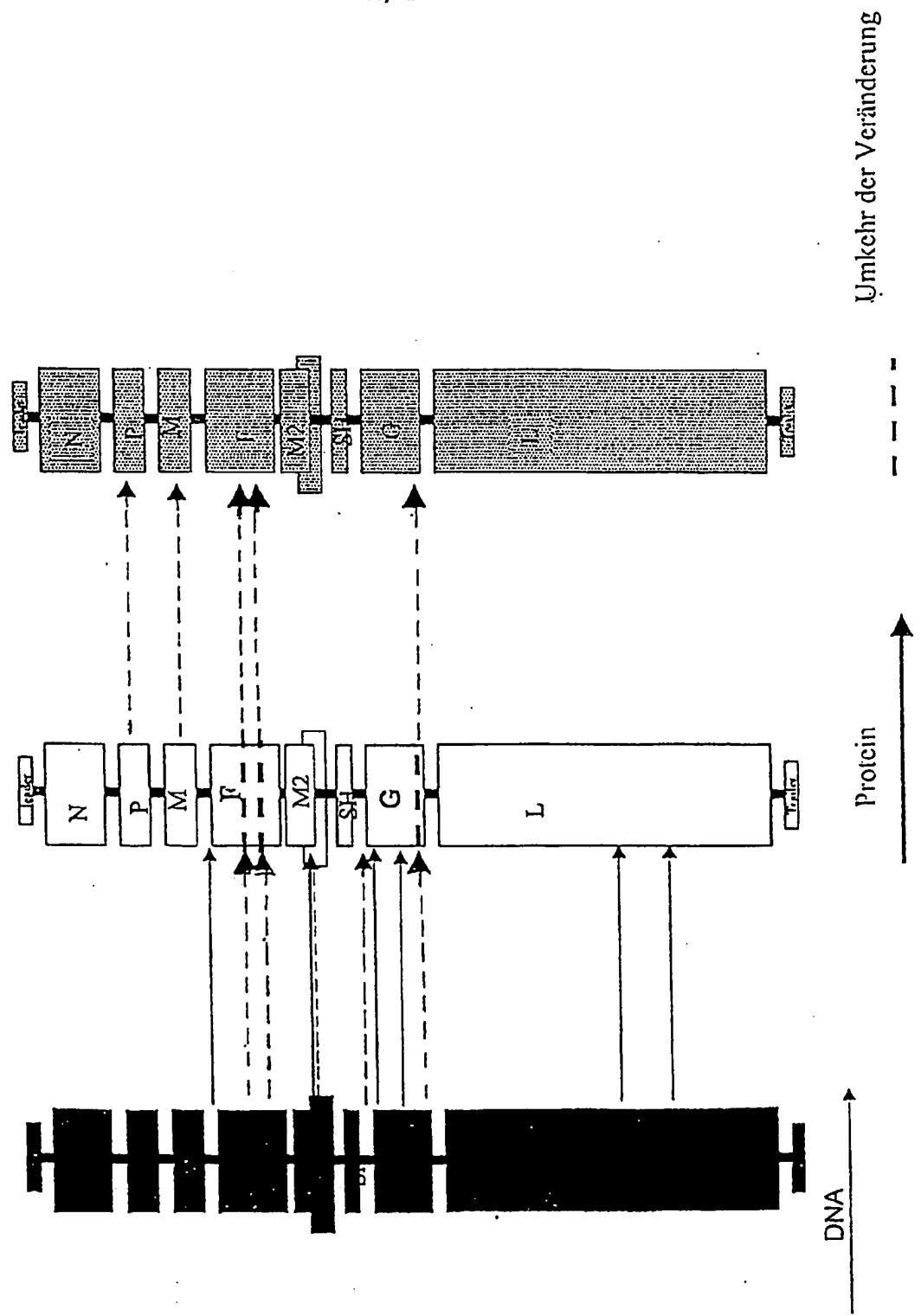
22. Impfstoff gemäß Anspruch 20, wobei das Virus ein attenuiertes Virus ist und wobei es mit einer geeigneten Menge Interleukin-12 (IL-12) oder Interleukin-18 (IL-18) formuliert wird.
23. Verfahren für die Herstellung eines Impfstoffs, gerichtet gegen Mitglieder der Gattung Metapneumovirus oder RSV oder ein Virus, das eine bedeutende genetische Homologie im F-Proteinbereich mit einem Mitglied der Gattung Metapneumovirus aufweist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:
  - a) Bereitstellung eines virulenten Virus, gegen das ein Impfstoff entwickelt werden soll,
  - b) Bereitstellung einer Modifikation in der Nucleinsäuresequenz, die für Region aa 293-296 des F-Proteins kodiert oder einer Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, des Virus und
  - c) Erhalt eines attenuierten Lebendvirus, umfassend die obige Modifikation.
24. Verfahren gemäß Anspruch 23, wobei die Modifikation eine Modifikation wie definiert in einem der Ansprüche 2 bis 16 betrifft.
25. Verfahren gemäß Ansprüchen 23 oder 24, wobei das Virus ein Virus ist, ausgewählt aus der Gruppe wie definiert gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19.
26. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 23 bis 25, wobei die Bereitstellung einer Modifikation wie folgt erhalten wird:

- i) Herstellung einer Volllängen-DNA-Kopie des viralen Genoms des Virus, gegen das ein Impfstoff entwickelt werden soll,
  - ii) Bereitstellung von Kopien von Volllängen-DNA durch Ligation von Teillängen PCR-Produkten, die eine Veränderung in Region aa 293-296 einführen oder in eine Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV,
  - iii) Virusrettung von den Volllängen-DNA-Kopien unter Verwendung von z.B. Hühnerpocken-T7-Polymerase-Rekombinant oder zellulärer ribosomaler polI RNA-Polymerase.
27. Attenuiertes Lebendvirus, das zur Gattung Metapneumovirus oder Pneumovirus gehört, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Modifikation im Bereich aa 293-296 des F-Proteins oder in einem Bereich mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, umfaßt.
28. Attenuiertes Lebendvirus gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Modifikation wie definiert in einem der Ansprüche 2 bis 16 ist.
29. Attenuiertes Lebendvirus gemäß Ansprüchen 27 oder 28, wobei das Virus ein Virus ist wie definiert in einem der Ansprüche 17 bis 19.
30. Wirtszelle, umfassend ein Virus gemäß einem der Ansprüche 27 bis 29.
31. DNA- oder cDNA-Sequenz wie definiert in einer der SEQ ID NO 28, 29, 30, 31, 32, 33 oder 34.

32. RNA-Sequenz korrespondierend zu der DNA- oder cDNA-Sequenz wie definiert in Anspruch 31.
33. F-Protein eines Mitglieds der Gattung Metapneumovirus oder RSV oder eines Virus, das eine bedeutende genetische Homologie im F-Protein zu einem Mitglied der Gattung Metapneumovirus aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Modifikation in der aa 293-296 Region oder einer Region mit derselben Funktionalität, wie aa 323-328 bei RSV, wie definiert in einem der Ansprüche 1 bis 16 umfaßt.
34. Vektor, umfassend die DNA-, cDNA- oder RNA-Sequenz gemäß Ansprüchen 31 oder 32.
35. Attenuiertes Lebendvirus, erhältlich durch das Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 23 bis 26.
36. Plasmid, umfassend die DNA-, cDNA- oder RNA-Sequenz gemäß Anspruch 31 oder 32.
37. Verwendung des F-Proteins wie definiert in Anspruch 33 oder des attenuierten Lebendvirus wie definiert in Ansprüche 27 bis 29 oder 35 für die Herstellung eines Impfstoffs zur Verhinderung einer Störung oder Erkrankung, ausgelöst durch einen der Viren wie definiert in einem der Ansprüche 17 bis 19.
38. Primer, gekennzeichnet durch eine der SEQ ID NO 35 bis 76.

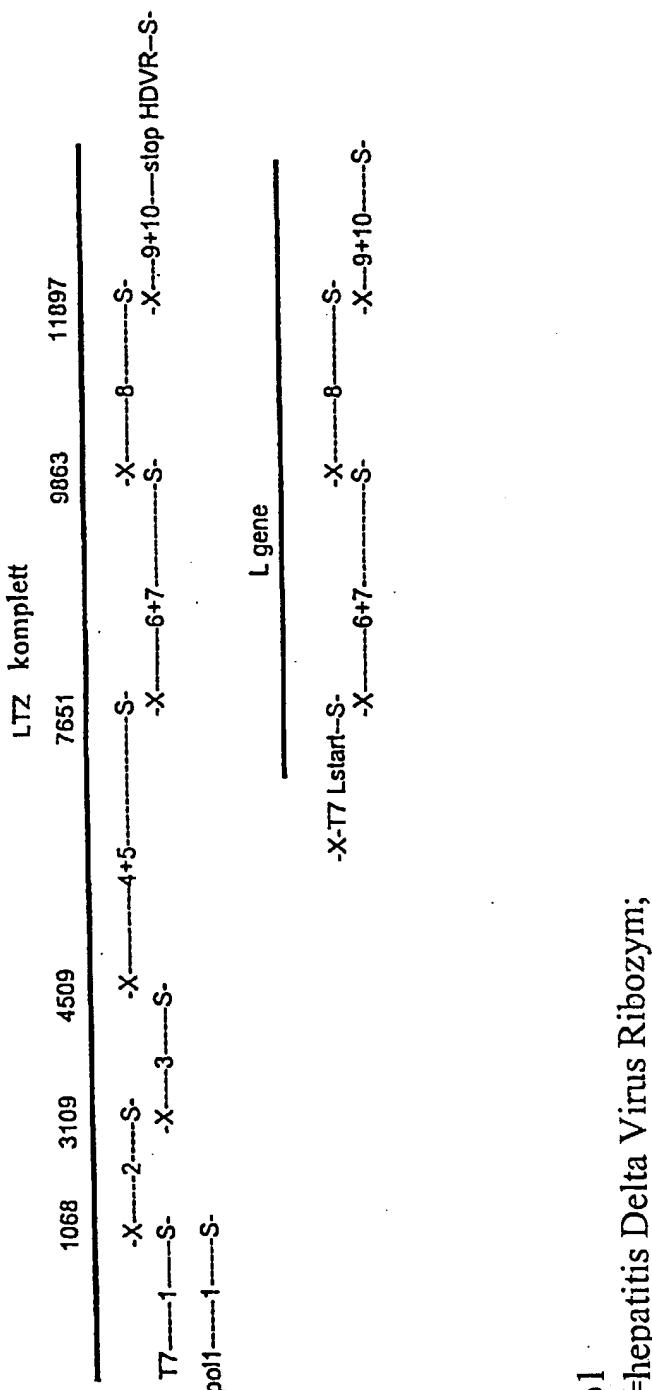
1/4

Fig. 1 Beispielhafte Sequenzveränderungen während Attenuierung und Reversion



2/4

Fig. 2



S = sal 1  
 X = Xho 1  
 HDVR = hepatitis Delta Virus Ribozym;

3/4

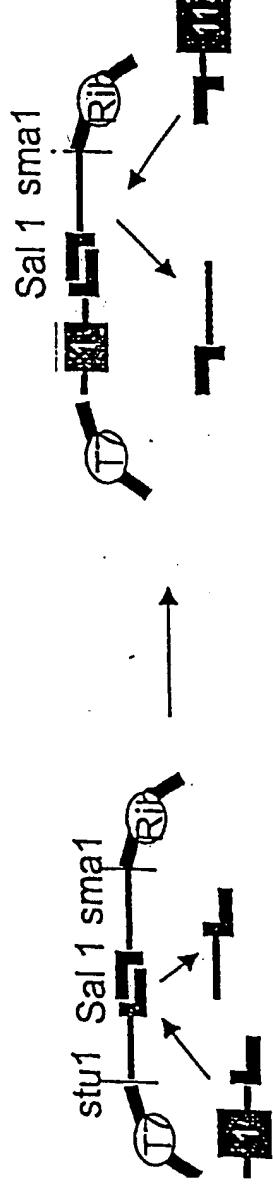
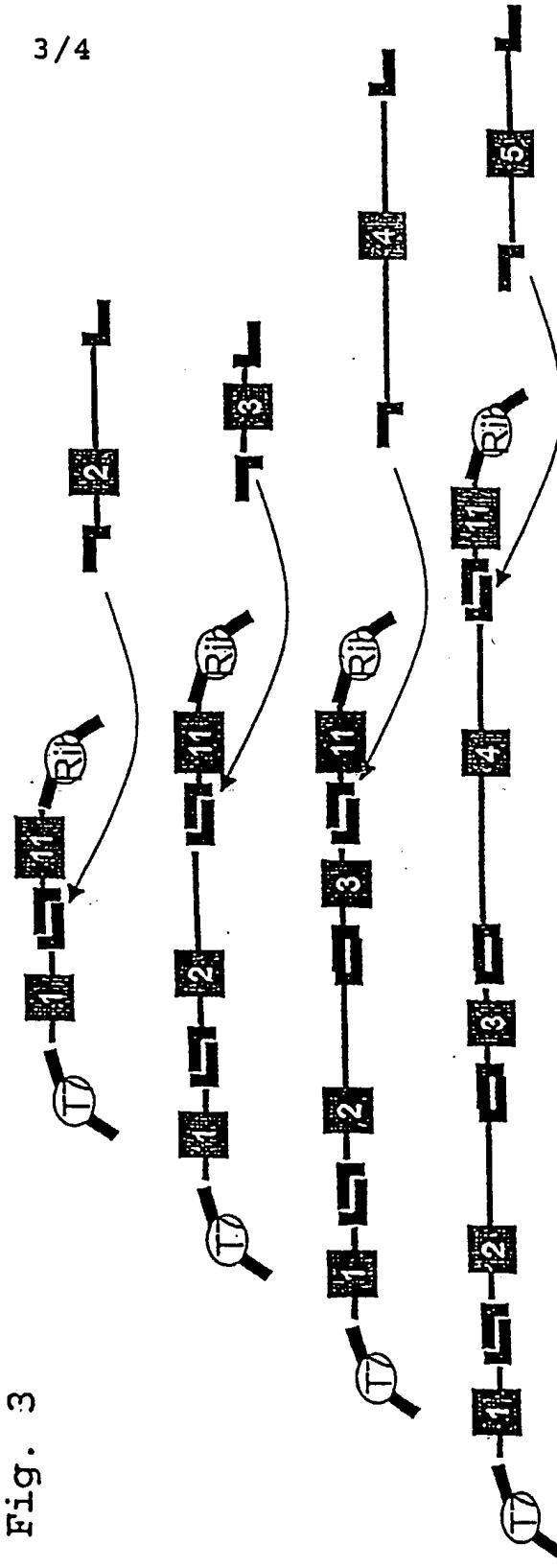


Fig. 3



ETC bis zum Gesamtgenom

**Fig. 4**

Änderungen an Position aa 293-296 des Fusionsproteins

R K K K

....TGT AGG AAA AAG AAA GGC....

\* \* \* \* \*

Modifzierende PCR-Primer, Veränderung der Sequenzen zu:

R R R R

....TGT AGG AGA CGC CGC GGC .....

\* \* \* \* \*\*\* \*\*\*

- \* 1 Substitution ergibt E
- \*\* 2 Substitutionen ergeben E
- \*\*\* 3 Substitutionen ergeben E

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Heinz Lohmann Animal Health GmbH&Co KG

<120> Attenuierung von Metapneumovirus

<130> 91691m6

<140>

<141>

<160> 79

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 1

Arg Arg Arg Arg

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 2

Arg Arg Arg Lys

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 3

Arg Arg Lys Lys

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 4

Arg Lys Lys Lys

1

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 5

Lys Lys Lys Lys

1

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 6

Lys Lys Lys Arg

1

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 7

Lys Lys Arg Arg

1

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 8

Lys Arg Arg Arg

1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 9

Ser Lys Lys Lys

1

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 10

Ser Arg Arg Arg

1

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 11

Ser Lys Lys Arg

1

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 12

Ser Lys Arg Arg

1

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 13

Ser Arg Arg Lys

1

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 14

Ser Arg Lys Arg

1

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 15

Ser Lys Arg Lys

1

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 16

Lys Gly Lys Lys

1

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz.

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 17

Lys Gly Arg Arg

1

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 18

Lys Gly Arg Lys

1

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 19

Lys Gly Lys Arg

1

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 20

Arg Gly Lys Lys

1

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 21

Arg Gly Arg Arg

1

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 22

Arg Gly Arg Lys

1

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 23

Arg Gly Lys Arg

1

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptid

<400> 24

Arg Lys Glu Lys

1

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> APV-Virus Typ B

<400> 25

Arg His Glu Arg

1

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> APV-Virus Typ C

<400> 26

Ser Gly Lys Asp

1

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> humanes Metapneumovirus

<400> 27

Ser Gly Lys Lys

1

<210> 28

<211> 539

<212> PRT

<213> humanes Metapneumovirus

<220>

<223> modifiziertes F-Protein

<400> 28

Met Ser Trp Lys Val Val Ile Ile Phe Ser Leu Leu Ile Thr Pro Gln

1

5

10

15

His Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Cys Ser Thr Ile Thr

20	25	30
Glu Gly Tyr Leu Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Asn Val Phe		
35	40	45
Thr Leu Glu Val Gly Asp Val Gln Asn Leu Thr Cys Ala Asp Gly Pro		
50	55	60
Ser Leu Ile Lys Thr Glu Leu Asp Leu Thr Lys Ser Ala Leu Arg Glu		
65	70	75
Leu Arg Thr Val Ser Ala Asp Gln Leu Ala Arg Glu Glu Gln Ile Glu		
85	90	95
Asn Pro Arg Gln Ser Arg Phe Val Leu Gly Ala Ile Ala Leu Gly Val		
100	105	110
Ala Thr Ala Ala Ala Val Thr Ala Gly Val Ala Ile Ala Lys Thr Ile		
115	120	125
Arg Leu Glu Ser Glu Val Thr Ala Ile Lys Asn Ala Leu Lys Lys Thr		
130	135	140
Asn Glu Ala Val Ser Thr Leu Gly Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Thr		
145	150	155
Ala Val Arg Glu Leu Lys Asp Phe Val Ser Lys Asn Leu Thr Arg Ala		
165	170	175
Ile Asn Lys Asn Lys Cys Asp Ile Ala Asp Leu Lys Met Ala Val Ser		
180	185	190
Phe Ser Gln Phe Asn Arg Arg Phe Leu Asn Val Val Arg Gln Phe Ser		
195	200	205
Asp Asn Ala Gly Ile Thr Pro Ala Ile Ser Leu Asp Leu Met Thr Asp		
210	215	220

Ala Glu Leu Ala Arg Ala Val Ser Asn Met Pro Thr Ser Ala Gly Gln  
225 230 235 240

Ile Lys Leu Met Leu Glu Asn Arg Ala Met Val Arg Arg Lys Gly Phe  
245 250 255

Gly Phe Leu Ile Gly Val Tyr Gly Ser Ser Val Ile Tyr Met Val Gln  
260 265 270

Leu Pro Ile Phe Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Ile Val Lys Ala  
275 280 285

Ala Pro Ser Cys Arg Arg Arg Gly Asn Tyr Ala Cys Leu Leu Arg  
290 295 300

Glu Asp Gln Gly Trp Tyr Cys Gln Asn Ala Gly Ser Thr Val Tyr Tyr  
305 310 315 320

Pro Asn Glu Lys Asp Cys Glu Thr Arg Gly Asp His Val Phe Cys Asp  
325 330 335

Thr Ala Ala Gly Ile Asn Val Ala Glu Gln Ser Lys Glu Cys Asn Ile  
340 345 350

Asn Ile Ser Thr Thr Asn Tyr Pro Cys Lys Val Ser Thr Gly Arg His  
355 360 365

Pro Ile Ser Met Val Ala Leu Ser Pro Leu Gly Ala Leu Val Ala Cys  
370 375 380

Tyr Lys Gly Val Ser Cys Ser Ile Gly Ser Asn Arg Val Gly Ile Ile  
385 390 395 400

Lys Gln Leu Asn Lys Gly Cys Ser Tyr Ile Thr Asn Gln Asp Ala Asp  
405 410 415

Thr Val Thr Ile Asp Asn Thr Val Tyr Gln Leu Ser Lys Val Glu Gly  
420 425 430

Glu Gln His Val Ile Lys Gly Arg Pro Val Ser Ser Ser Phe Asp Pro  
435 440 445

Val Lys Phe Pro Glu Asp Gln Phe Asn Val Ala Leu Asp Gln Val Phe  
450 455 460

Glu Ser Ile Glu Asn Ser Gln Ala Leu Val Asp Gln Ser Asn Arg Ile  
465 470 475 480

Leu Ser Ser Ala Glu Lys Gly Asn Thr Gly Phe Ile Ile Val Ile Ile  
485 490 495

Leu Ile Ala Val Leu Gly Ser Thr Met Ile Leu Val Ser Val Phe Ile  
500 505 510

Ile Ile Lys Lys Thr Lys Pro Thr Gly Ala Pro Pro Glu Leu Ser  
515 520 525

Gly Val Thr Asn Asn Gly Phe Ile Pro His Asn  
530 535

<210> 29

<211> 539

<212> PRT

<213> humanes Metapneumovirus

<220>

<223> modifiziertes F-Protein

<400> 29

Met Ser Trp Lys Val Val Ile Ile Phe Ser Leu Leu Ile Thr Pro Gln

1

5

10

15

His Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Cys Ser Thr Ile Thr  
20 25 30

Glu Gly Tyr Leu Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Asn Val Phe  
35 40 45

Thr Leu Glu Val Gly Asp Val Glu Asn Leu Thr Cys Ala Asp Gly Pro  
50 55 60

Ser Leu Ile Lys Thr Glu Leu Asp Leu Thr Lys Ser Ala Leu Arg Glu  
65 70 75 80

Leu Arg Thr Val Ser Ala Asp Gln Leu Ala Arg Glu Glu Gln Ile Glu  
85 90 95

Asn Pro Arg Gln Ser Arg Phe Val Leu Gly Ala Ile Ala Leu Gly Val  
100 105 110

Ala Thr Ala Ala Ala Val Thr Ala Gly Val Ala Ile Ala Lys Thr Ile  
115 120 125

Arg Leu Glu Ser Glu Val Thr Ala Ile Lys Asn Ala Leu Lys Thr  
130 135 140

Asn Glu Ala Val Ser Thr Leu Gly Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Thr  
145 150 155 160

Ala Val Arg Glu Leu Lys Asp Phe Val Ser Lys Asn Leu Thr Arg Ala  
165 170 175

Ile Asn Lys Asn Lys Cys Asp Ile Ala Asp Leu Lys Met Ala Val Ser  
180 185 190

Phe Ser Gln Phe Asn Arg Arg Phe Leu Asn Val Val Arg Gln Phe Ser  
195 200 205

Asp Asn Ala Gly Ile Thr Pro Ala Ile Ser Leu Asp Leu Met Thr Asp

210	215	220
Ala Glu Leu Ala Arg Ala Val Ser Asn Met Pro Thr Ser Ala Gly Gln		
225	230	235
Ile Lys Leu Met Leu Glu Asn Arg Ala Met Val Arg Arg Lys Gly Phe		
245	250	255
Gly Phe Leu Ile Gly Val Tyr Gly Ser Ser Val Ile Tyr Met Val Gln		
260	265	270
Leu Pro Ile Phe Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Ile Val Lys Ala		
275	280	285
Ala Pro Ser Cys Arg Arg Lys Gly Asn Tyr Ala Cys Leu Leu Arg		
290	295	300
Glu Asp Gln Gly Trp Tyr Cys Gln Asn Ala Gly Ser Thr Val Tyr Tyr		
305	310	315
Pro Asn Glu Lys Asp Cys Glu Thr Arg Gly Asp His Val Phe Cys Asp		
325	330	335
Thr Ala Ala Gly Ile Asn Val Ala Glu Gln Ser Lys Glu Cys Asn Ile		
340	345	350
Asn Ile Ser Thr Thr Asn Tyr Pro Cys Lys Val Ser Thr Gly Arg His		
355	360	365
Pro Ile Ser Met Val Ala Leu Ser Pro Leu Gly Ala Leu Val Ala Cys		
370	375	380
Tyr Lys Gly Val Ser Cys Ser Ile Gly Ser Asn Arg Val Gly Ile Ile		
385	390	395
Lys Gln Leu Asn Lys Gly Cys Ser Tyr Ile Thr Asn Gln Asp Ala Asp		
405	410	415

Thr Val Thr Ile Asp Asn Thr Val Tyr Gln Leu Ser Lys Val Glu Gly  
420 425 430

Glu Gln His Val Ile Lys Gly Arg Pro Val Ser Ser Ser Phe Asp Pro  
435 440 445

Val Lys Phe Pro Glu Asp Gln Phe Asn Val Ala Leu Asp Gln Val Phe  
450 455 460

Glu Ser Ile Glu Asn Ser Gln Ala Leu Val Asp Gln Ser Asn Arg Ile  
465 470 475 480

Leu Ser Ser Ala Glu Lys Gly Asn Thr Gly Phe Ile Ile Val Ile Ile  
485 490 495

Leu Ile Ala Val Leu Gly Ser Thr Met Ile Leu Val Ser Val Phe Ile  
500 505 510

Ile Ile Lys Lys Thr Lys Lys Pro Thr Gly Ala Pro Pro Glu Leu Ser  
515 520 525

Gly Val Thr Asn Asn Gly Phe Ile Pro His Asn  
530 535

<210> 30

<211> 539

<212> PRT

<213> humanes Metapneumovirus

<220>

<223> modifiziertes F-Protein

<400> 30

Met Ser Trp Lys Val Val Ile Ile Phe Ser Leu Leu Ile Thr Pro Gln  
1 5 10 15

His Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Cys Ser Thr Ile Thr  
20 25 30

Glu Gly Tyr Leu Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Asn Val Phe  
35 40 45

Thr Leu Glu Val Gly Asp Val Glu Asn Leu Thr Cys Ala Asp Gly Pro  
50 55 60

Ser Leu Ile Lys Thr Glu Leu Asp Leu Thr Lys Ser Ala Leu Arg Glu  
65 70 75 80

Leu Arg Thr Val Ser Ala Asp Gln Leu Ala Arg Glu Glu Gln Ile Glu  
85 90 95

Asn Pro Arg Gln Ser Arg Phe Val Leu Gly Ala Ile Ala Leu Gly Val  
100 105 110

Ala Thr Ala Ala Ala Val Thr Ala Gly Val Ala Ile Ala Lys Thr Ile  
115 120 125

Arg Leu Glu Ser Glu Val Thr Ala Ile Lys Asn Ala Leu Lys Lys Thr  
130 135 140

Asn Glu Ala Val Ser Thr Leu Gly Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Thr  
145 150 155 160

Ala Val Arg Glu Leu Lys Asp Phe Val Ser Lys Asn Leu Thr Arg Ala  
165 170 175

Ile Asn Lys Asn Lys Cys Asp Ile Ala Asp Leu Lys Met Ala Val Ser  
180 185 190

Phe Ser Gln Phe Asn Arg Arg Phe Leu Asn Val Val Arg Gln Phe Ser  
195 200 205

Asp Asn Ala Gly Ile Thr Pro Ala Ile Ser Leu Asp Leu Met Thr Asp  
210 215 220

Ala Glu Leu Ala Arg Ala Val Ser Asn Met Pro Thr Ser Ala Gly Gln  
225 230 235 240

Ile Lys Leu Met Leu Glu Asn Arg Ala Met Val Arg Arg Lys Gly Phe  
245 250 255

Gly Phe Leu Ile Gly Val Tyr Gly Ser Ser Val Ile Tyr Met Val Gln  
260 265 270

Leu Pro Ile Phe Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Ile Val Lys Ala  
275 280 285

Ala Pro Ser Cys Arg Arg Lys Lys Gly Asn Tyr Ala Cys Leu Leu Arg  
290 295 300

Glu Asp Gln Gly Trp Tyr Cys Gln Asn Ala Gly Ser Thr Val Tyr Tyr  
305 310 315 320

Pro Asn Glu Lys Asp Cys Glu Thr Arg Gly Asp His Val Phe Cys Asp  
325 330 335

Thr Ala Ala Gly Ile Asn Val Ala Glu Gln Ser Lys Glu Cys Asn Ile  
340 345 350

Asn Ile Ser Thr Thr Asn Tyr Pro Cys Lys Val Ser Thr Gly Arg His  
355 360 365

Pro Ile Ser Met Val Ala Leu Ser Pro Leu Gly Ala Leu Val Ala Cys  
370 375 380

Tyr Lys Gly Val Ser Cys Ser Ile Gly Ser Asn Arg Val Gly Ile Ile  
385 390 395 400

Lys Gln Leu Asn Lys Gly Cys Ser Tyr Ile Thr Asn Gln Asp Ala Asp

405

410

415

Thr Val Thr Ile Asp Asn Thr Val Tyr Gln Leu Ser Lys Val Glu Gly

420

425

430

Glu Glu His Val Ile Lys Gly Arg Pro Val Ser Ser Ser Phe Asp Pro

435

440

445

Val Lys Phe Pro Glu Asp Gln Phe Asn Val Ala Leu Asp Gln Val Phe

450

455

460

Glu Ser Ile Glu Asn Ser Gln Ala Leu Val Asp Gln Ser Asn Arg Ile

465

470

475

480

Leu Ser Ser Ala Glu Lys Gly Asn Thr Gly Phe Ile Ile Val Ile Ile

485

490

495

Leu Ile Ala Val Leu Gly Ser Thr Met Ile Leu Val Ser Val Phe Ile

500

505

510

Ile Ile Lys Lys Thr Lys Lys Pro Thr Gly Ala Pro Pro Glu Leu Ser

515

520

525

Gly Val Thr Asn Asn Gly Phe Ile Pro His Asn

530

535

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 539

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; humanes Metapneumovirus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; modifiziertes F-Protein

&lt;400&gt; 31

Met Ser Trp Lys Val Val Ile Ile Phe Ser Leu Leu Ile Thr Pro Gln

1                   5                   10                   15

His Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Cys Ser Thr Ile Thr  
20                   25                   30

Glu Gly Tyr Leu Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Asn Val Phe  
35                   40                   45

Thr Leu Glu Val Gly Asp Val Glu Asn Leu Thr Cys Ala Asp Gly Pro  
50                   55                   60

Ser Leu Ile Lys Thr Glu Leu Asp Leu Thr Lys Ser Ala Leu Arg Glu  
65                   70                   75                   80

Leu Arg Thr Val Ser Ala Asp Gln Leu Ala Arg Glu Glu Gln Ile Glu  
85                   90                   95

Asn Pro Arg Gln Ser Arg Phe Val Leu Gly Ala Ile Ala Leu Gly Val  
100                 105                 110

Ala Thr Ala Ala Ala Val Thr Ala Gly Val Ala Ile Ala Lys Thr Ile  
115                 120                 125

Arg Leu Glu Ser Glu Val Thr Ala Ile Lys Asn Ala Leu Lys Lys Thr  
130                 135                 140

Asn Glu Ala Val Ser Thr Leu Gly Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Thr  
145                 150                 155                 160

Ala Val Arg Glu Leu Lys Asp Phe Val Ser Lys Asn Leu Thr Arg Ala  
165                 170                 175

Ile Asn Lys Asn Lys Cys Asp Ile Ala Asp Leu Lys Met Ala Val Ser  
180                 185                 190

Phe Ser Gln Phe Asn Arg Arg Phe Leu Asn Val Val Arg Gln Phe Ser  
195                 200                 205

Asp Asn Ala Gly Ile Thr Pro Ala Ile Ser Leu Asp Leu Met Thr Asp

210

215

220

Ala Glu Leu Ala Arg Ala Val Ser Asn Met Pro Thr Ser Ala Gly Gln

225

230

235

240

Ile Lys Leu Met Leu Glu Asn Arg Ala Met Val Arg Arg Lys Gly Phe

245

250

255

Gly Phe Leu Ile Gly Val Tyr Gly Ser Ser Val Ile Tyr Met Val Gln

260

265

270

Leu Pro Ile Phe Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Ile Val Lys Ala

275

280

285

Ala Pro Ser Cys Lys Lys Arg Arg Gly Asn Tyr Ala Cys Leu Leu Arg

290

295

300

Glu Asp Gln Gly Trp Tyr Cys Gln Asn Ala Gly Ser Thr Val Tyr Tyr

305

310

315

320

Pro Asn Glu Lys Asp Cys Glu Thr Arg Gly Asp His Val Phe Cys Asp

325

330

335

Thr Ala Ala Gly Ile Asn Val Ala Glu Gln Ser Lys Glu Cys Asn Ile

340

345

350

Asn Ile Ser Thr Thr Asn Tyr Pro Cys Lys Val Ser Thr Gly Arg His

355

360

365

Pro Ile Ser Met Val Ala Leu Ser Pro Leu Gly Ala Leu Val Ala Cys

370

375

380

Tyr Lys Gly Val Ser Cys Ser Ile Gly Ser Asn Arg Val Gly Ile Ile

385

390

395

400

Lys Gln Leu Asn Lys Gly Cys Ser Tyr Ile Thr Asn Gln Asp Ala Asp  
405 410 415

Thr Val Thr Ile Asp Asn Thr Val Tyr Gln Leu Ser Lys Val Glu Gly  
420 425 430

Glu Gln His Val Ile Lys Gly Arg Pro Val Ser Ser Phe Asp Pro  
435 440 445

Val Lys Phe Pro Glu Asp Gln Phe Asn Val Ala Leu Asp Gln Val Phe  
450 455 460

Glu Ser Ile Glu Asn Ser Gln Ala Leu Val Asp Gln Ser Asn Arg Ile  
465 470 475 480

Leu Ser Ser Ala Glu Lys Gly Asn Thr Gly Phe Ile Ile Val Ile Ile  
485 490 495

Leu Ile Ala Val Leu Gly Ser Thr Met Ile Leu Val Ser Val Phe Ile  
500 505 510

Ile Ile Lys Lys Thr Lys Lys Pro Thr Gly Ala Pro Pro Glu Leu Ser  
515 520 525

Gly Val Thr Asn Asn Gly Phe Ile Pro His Asn  
530 535

<210> 32

<211> 539

<212> PRT

<213> humanes Metapneumovirus

<220>

<223> modifiziertes F-Protein

<400> 32

Met Ser Trp Lys Val Val Ile Ile Phe Ser Leu Leu Ile Thr Pro Gln  
1 5 10 15

His Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Cys Ser Thr Ile Thr  
20 25 30

Glu Gly Tyr Leu Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Asn Val Phe  
35 40 45

Thr Leu Glu Val Gly Asp Val Glu Asn Leu Thr Cys Ala Asp Gly Pro  
50 55 60

Ser Leu Ile Lys Thr Glu Leu Asp Leu Thr Lys Ser Ala Leu Arg Glu  
65 70 75 80

Leu Arg Thr Val Ser Ala Asp Gln Leu Ala Arg Glu Glu Gln Ile Glu  
85 90 95

Asn Pro Arg Gln Ser Arg Phe Val Leu Gly Ala Ile Ala Leu Gly Val  
100 105 110

Ala Thr Ala Ala Ala Val Thr Ala Gly Val Ala Ile Ala Lys Thr Ile  
115 120 125

Arg Leu Glu Ser Glu Val Thr Ala Ile Lys Asn Ala Leu Lys Lys Thr  
130 135 140

Asn Glu Ala Val Ser Thr Leu Gly Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Thr  
145 150 155 160

Ala Val Arg Glu Leu Lys Asp Phe Val Ser Lys Asn Leu Thr Arg Ala  
165 170 175

Ile Asn Lys Asn Lys Cys Asp Ile Ala Asp Leu Lys Met Ala Val Ser  
180 185 190

Phe Ser Gin Phe Asn Arg Arg Phe Leu Asn Val Val Arg Gln Phe Ser

195 200 205

Asp Asn Ala Gly Ile Thr Pro Ala Ile Ser Leu Asp Leu Met Thr Asp  
210 215 220

Ala Glu Leu Ala Arg Ala Val Ser Asn Met Pro Thr Ser Ala Gly Gln  
225 230 235 240

Ile Lys Leu Met Leu Glu Asn Arg Ala Met Val Arg Arg Lys Gly Phe  
245 250 255

Gly Phe Leu Ile Gly Val Tyr Gly Ser Ser Val Ile Tyr Met Val Gln  
260 265 270

Leu Pro Ile Phe Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Ile Val Lys Ala  
275 280 285

Ala Pro Ser Cys Lys Arg Arg Arg Gly Asn Tyr Ala Cys Leu Leu Arg  
290 295 300

Glu Asp Gln Gly Trp Tyr Cys Gln Asn Ala Gly Ser Thr Val Tyr Tyr  
305 310 315 320

Pro Asn Glu Lys Asp Cys Glu Thr Arg Gly Asp His Val Phe Cys Asp  
325 330 335

Thr Ala Ala Gly Ile Asn Val Ala Glu Gln Ser Lys Glu Cys Asn Ile  
340 345 350

Asn Ile Ser Thr Thr Asn Tyr Pro Cys Lys Val Ser Thr Gly Arg His  
355 360 365

Pro Ile Ser Met Val Ala Leu Ser Pro Leu Gly Ala Leu Val Ala Cys  
370 375 380

Tyr Lys Gly Val Ser Cys Ser Ile Gly Ser Asn Arg Val Gly Ile Ile  
385 390 395 400

Lys Gln Leu Asn Lys Gly Cys Ser Tyr Ile Thr Asn Gln Asp Ala Asp  
405 410 415

Thr Val Thr Ile Asp Asn Thr Val Tyr Gln Leu Ser Lys Val Glu Gly  
420 425 430

Glu Gln His Val Ile Lys Gly Arg Pro Val Ser Ser Phe Asp Pro  
435 440 445

Val Lys Phe Pro Glu Asp Gln Phe Asn Val Ala Leu Asp Gln Val Phe  
450 455 460

Glu Ser Ile Glu Asn Ser Gln Ala Leu Val Asp Gln Ser Asn Arg Ile  
465 470 475 480

Leu Ser Ser Ala Glu Lys Gly Asn Thr Gly Phe Ile Ile Val Ile Ile  
485 490 495

Leu Ile Ala Val Leu Gly Ser Thr Met Ile Leu Val Ser Val Phe Ile  
500 505 510

Ile Ile Lys Lys Thr Lys Lys Pro Thr Gly Ala Pro Pro Glu Leu Ser  
515 520 525

Gly Val Thr Asn Asn Gly Phe Ile Pro His Asn  
530 535

<210> 33

<211> 539

<212> PRT

<213> humanes Metapneumovirus

<220>

<223> modifiziertes F-Protein

<400> 33

Met Ser Trp Lys Val Val Ile Ile Phe Ser Leu Leu Ile Thr Pro Gln

1 5 10 15

His Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Cys Ser Thr Ile Thr

20 25 30

Glu Gly Tyr Leu Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Asn Val Phe

35 40 45

Thr Leu Glu Val Gly Asp Val Glu Asn Leu Thr Cys Ala Asp Gly Pro

50 55 60

Ser Leu Ile Lys Thr Glu Leu Asp Leu Thr Lys Ser Ala Leu Arg Glu

65 70 75 80

Leu Arg Thr Val Ser Ala Asp Gln Leu Ala Arg Glu Glu Gln Ile Glu

85 90 95

Asn Pro Arg Gln Ser Arg Phe Val Leu Gly Ala Ile Ala Leu Gly Val

100 105 110

Ala Thr Ala Ala Ala Val Thr Ala Gly Val Ala Ile Ala Lys Thr Ile

115 120 125

Arg Leu Glu Ser Glu Val Thr Ala Ile Lys Asn Ala Leu Lys Lys Thr

130 135 140

Asn Glu Ala Val Ser Thr Leu Gly Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Thr

145 150 155 160

Ala Val Arg Glu Leu Lys Asp Phe Val Ser Lys Asn Leu Thr Arg Ala

165 170 175

Ile Asn Lys Asn Lys Cys Asp Ile Ala Asp Leu Lys Met Ala Val Ser

180 185 190

Phe Ser Gln Phe Asn Arg Arg Phe Leu Asn Val Val Arg Gln Phe Ser  
195 200 205

Asp Asn Ala Gly Ile Thr Pro Ala Ile Ser Leu Asp Leu Met Thr Asp  
210 215 220

Ala Glu Leu Ala Arg Ala Val Ser Asn Met Pro Thr Ser Ala Gly Gln  
225 230 235 240

Ile Lys Leu Met Leu Glu Asn Arg Ala Met Val Arg Arg Lys Gly Phe  
245 250 255

Gly Phe Leu Ile Gly Val Tyr Gly Ser Ser Val Ile Tyr Met Val Gln  
260 265 270

Leu Pro Ile Phe Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Ile Val Lys Ala  
275 280 285

Ala Pro Ser Cys Ser Arg Arg Gly Asn Tyr Ala Cys Leu Leu Arg  
290 295 300

Glu Asp Gln Gly Trp Tyr Cys Gln Asn Ala Gly Ser Thr Val Tyr Tyr  
305 310 315 320

Pro Asn Glu Lys Asp Cys Glu Thr Arg Gly Asp His Val Phe Cys Asp  
325 330 335

Thr Ala Ala Gly Ile Asn Val Ala Glu Gln Ser Lys Glu Cys Asn Ile  
340 345 350

Asn Ile Ser Thr Thr Asn Tyr Pro Cys Lys Val Ser Thr Gly Arg His  
355 360 365

Pro Ile Ser Met Val Ala Leu Ser Pro Leu Gly Ala Leu Val Ala Cys  
370 375 380

Tyr Lys Gly Val Ser Cys Ser Ile Gly Ser Asn Arg Val Gly Ile Ile

385                   390                   395                   400

Lys Gln Leu Asn Lys Gly Cys Ser Tyr Ile Thr Asn Gln Asp Ala Asp  
405                   410                   415

Thr Val Thr Ile Asp Asn Thr Val Tyr Gln Leu Ser Lys Val Glu Gly  
420                   425                   430

Glu Gln His Val Ile Lys Gly Arg Pro Val Ser Ser Phe Asp Pro  
435                   440                   445

Val Lys Phe Pro Glu Asp Gln Phe Asn Val Ala Leu Asp Gln Val Phe  
450                   455                   460

Glu Ser Ile Glu Asn Ser Gln Ala Leu Val Asp Gln Ser Asn Arg Ile  
465                   470                   475                   480

Leu Ser Ser Ala Glu Lys Gly Asn Thr Gly Phe Ile Ile Val Ile Ile  
485                   490                   495

Leu Ile Ala Val Leu Gly Ser Thr Met Ile Leu Val Ser Val Phe Ile  
500                   505                   510

Ile Ile Lys Lys Thr Lys Lys Pro Thr Gly Ala Pro Pro Glu Leu Ser  
515                   520                   525

Gly Val Thr Asn Asn Gly Phe Ile Pro His Asn  
530                   535

<210> 34

<211> 539

<212> PRT

<213> humanes Metapneumovirus

<220>

<223> modifiziertes F-Protein

&lt;400&gt; 34

Met Ser Trp Lys Val Val Ile Ile Phe Ser Leu Leu Ile Thr Pro Gln

1 5 10 . 15

His Gly Leu Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Cys Ser Thr Ile Thr

20 . 25 . 30

Glu Gly Tyr Leu Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Asn Val Phe

35 40 45

Thr Leu Glu Val Gly Asp Val Glu Asn Leu Thr Cys Ala Asp Gly Pro

50 55 60

Ser Leu Ile Lys Thr Glu Leu Asp Leu Thr Lys Ser Ala Leu Arg Glu

65 70 75 80

Leu Arg Thr Val Ser Ala Asp Gln Leu Ala Arg Glu Glu Gln Ile Glu

85 90 95

Asn Pro Arg Gln Ser Arg Phe Val Leu Gly Ala Ile Ala Leu Gly Val

100 105 110

Ala Thr Ala Ala Ala Val Thr Ala Gly Val Ala Ile Ala Lys Thr Ile

115 120 125

Arg Leu Glu Ser Glu Val Thr Ala Ile Lys Asn Ala Leu Lys Lys Thr

130 135 140

Asn Glu Ala Val Ser Thr Leu Gly Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Thr

145 150 155 160

Ala Val Arg Glu Leu Lys Asp Phe Val Ser Lys Asn Leu Thr Arg Ala

165 170 175

Ile Asn Lys Asn Lys Cys Asp Ile Ala Asp Leu Lys Met Ala Val Ser

180 185 190

Phe Ser Gln Phe Asn Arg Arg Phe Leu Asn Val Val Arg Gln Phe Ser  
195 200 205

Asp Asn Ala Gly Ile Thr Pro Ala Ile Ser Leu Asp Leu Met Thr Asp  
210 215 220

Ala Glu Leu Ala Arg Ala Val Ser Asn Met Pro Thr Ser Ala Gly Gln  
225 230 235 240

Ile Lys Leu Met Leu Glu Asn Arg Ala Met Val Arg Arg Lys Gly Phe  
245 250 255

Gly Phe Leu Ile Gly Val Tyr Gly Ser Ser Val Ile Tyr Met Val Gln  
260 265 270

Leu Pro Ile Phe Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Ile Val Lys Ala  
275 280 285

Ala Pro Ser Cys Arg Gly Arg Arg Gly Asn Tyr Ala Cys Leu Leu Arg  
290 295 300

Glu Asp Gln Gly Trp Tyr Cys Gln Asn Ala Gly Ser Thr Val Tyr Tyr  
305 310 315 320

Pro Asn Glu Lys Asp Cys Glu Thr Arg Gly Asp His Val Phe Cys Asp  
325 330 335

Thr Ala Ala Gly Ile Asn Val Ala Glu Gln Ser Lys Glu Cys Asn Ile  
340 345 350

Asn Ile Ser Thr Thr Asn Tyr Pro Cys Lys Val Ser Thr Gly Arg His  
355 360 365

Pro Ile Ser Met Val Ala Leu Ser Pro Leu Gly Ala Leu Val Ala Cys  
370 375 380

Tyr Lys Gly Val Ser Cys Ser Ile Gly Ser Asn Arg Val Gly Ile Ile  
385                   390                   395                   400

Lys Gln Leu Asn Lys Gly Cys Ser Tyr Ile Thr Asn Gln Asp Ala Asp  
405                   410                   415

Thr Val Thr Ile Asp Asn Thr Val Tyr Gln Leu Ser Lys Val Glu Gly  
420                   425                   430

Glu Gln His Val Ile Lys Gly Arg Pro Val Ser Ser Phe Asp Pro  
435                   440                   445

Val Lys Phe Pro Glu Asp Gln Phe Asn Val Ala Leu Asp Gln Val Phe  
450                   455                   460

Glu Ser Ile Glu Asn Ser Gln Ala Leu Val Asp Gln Ser Asn Arg Ile  
465                   470                   475                   480

Leu Ser Ser Ala Glu Lys Gly Asn Thr Gly Phe Ile Ile Val Ile Ile  
485                   490                   495

Leu Ile Ala Val Leu Gly Ser Thr Met Ile Leu Val Ser Val Phe Ile  
500                   505                   510

Ile Ile Lys Lys Thr Lys Lys Pro Thr Gly Ala Pro Pro Glu Leu Ser  
515                   520                   525

Gly Val Thr Asn Asn Gly Phe Ile Pro His Asn  
530                   535

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 35

cgagaaaaaaa acgcattcaa gcagg

25

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 36

gatgtctagg cgaaatccct gc

22

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 37

acgagaaaaaa aacgcattca agcagttct

30

<210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 38

gggttatctat gatggtcgac agatgtg

27

<210> 39

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 39

ttaatacgac tcactatagg accaatatgg aaatatccga tgag

44

<210> 40

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 40

gctaaaaatt tgatgaatac ggttttttc tcgt

34

<210> 41

<211> 45

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 41

taatacgaact cactatagga cgagaaaaaa acgcattcaa gcagg

45

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 42

ctcaaggttg gggggtcgac c

21

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 43

acggggccggc cccctgcgtg

20

<210> 44

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 44

aaaagctttt caatttacgag aaaaaaaacgc attcaaggcag gttc

44

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 45

ctcaaggttt ggggggttcgac c

21

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 46

ggcatgtaca aagctcgagc cc

22

<210> 47  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 47  
cattgcaagt gatgttgtcg acattccc

28

<210> 48  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 48  
cctcgaaata ggaaatctcg agaacatcac

30

<210> 49  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 49

caagcataat tgccgcggcg tctcctacag agtgg

35

<210> 50

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 50

ccactctgtta ggagacgcccggccaattat gcttg

35

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 51

gcagggattt cgcgtggaca tcttc

25

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

## Oligonukleotid

&lt;400&gt; 52

caagtgaaga tctcgaggcg aaatccc

27

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

&lt;400&gt; 53

gatcgttattc aactcgagaa cttacctgac

30

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

&lt;400&gt; 54

gatcgttattc aactcgagaa cttacctgac

30

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 55

gctatgatct tttgcgtcga caaagcac

28

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 56

gtacatccag tgctttctcg aggc

24

<210> 57

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 57

cagtgacagg tttttggtcg actatg

26

<210> 58

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 58

gctgagggtg acataactcga gc

22

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 59

gcagccggac tcgagctctc cc

22

<210> 60

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz.

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 60

tagaattcac ctgcaggcat gc

22

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 61

gaggatcccc gggttaccgag c

21

<210> 62

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 62

cggatatcca caggatccgg ggataacgc

29

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 63

cgagatcctc gagccggatc ctc

23

/ <210> 64  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 64  
ttaatacgac tcactatagg gacaagtcaa aaatgtctct tg

42

<210> 65  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 65  
gtcaaaatgt ctcttgaaag

20

<210> 66  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 66

cagggaaaga cattgttac

19

<210> 67

<211> 41

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 67

ttaatacgcac tcactatagg gacaagtaac aatgtcttc c

41

<210> 68

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 68

gtaacaatgt ctttccctg

19

<210> 69

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 69

gacttgcctt atttttcat aactacagat caag

34

<210> 70

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 70

ttaatacgac tcactatagg gacaagtcaa gatgtctag

39

<210> 71

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> .71

gatgtctagg cgaaatccc

19

<210> 72

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 72

gcattgcact taatttattgc tgtcaccc

28

<210> 73

<211> 46

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 73

ttaatacgac tcactatagg accaatatgg aaatatccga tgagtc

46

<210> 74

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 74

gaataaaaaa caaggaccaa tatggaaata tccgatgag

39

<210> 75

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 75

ccactctgt a ggagacgccc g cggcaattat gcttg

35

<210> 76

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Oligonukleotid

<400> 76

caaggataat t gcccgcggcg tctcctacag agtgg

35

<210> 77

<211> 6

<212> PRT

<213> humanes RSV

<400> 77

Thr Thr Asn Thr Lys Glu

1

5

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> humanes RSV

<400> 78

Thr Thr Asn Ile Lys Glu

1

5

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> bovines RSV

<400> 79

Thr Thr Asp Asn Lys Glu

1

5